

**BESTIMMUNG DER AKTIVITÄT DES
DUODENALEN CALCIUMBINDENDEN
PROTEINS ALS PARAMETER
VITAMIN D-ARTIGER WIRKUNG**

Horst Nitsche

1980

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr. H. Zucker

BESTIMMUNG DER AKTIVITÄT DES DUODENALEN
CALCIUMBINDENDEN PROTEINS ALS PARAMETER
VITAMIN D-ARTIGER WIRKUNG

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig - Maximilians - Universität München

von
HORST NITSCHKE
aus

Wartenberg
München 1980

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Dekan: Prof. Dr. J. v. Sandersleben

Referent: Prof. Dr. H. Zucker

Korreferent: Prof. Dr. W. Rössner

Tag der Promotion: 25. Juli 1980



INHALTSVERZEICHNIS

1.	<u>EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG</u>	1
2.	<u>LITERATURÜBERSICHT</u>	3
2.1.	ENTDECKUNG DES CaBP	3
2.2.	VORKOMMEN DES CaBP	3
2.3.	BISHER ERMITTELTE CHARAKTERISTIKA CALCIUM-BINDENDER PROTEINE VERSCHIEDENER SPEZIES UND GEWEBE	5
2.4.	METHODEN ZUR BESTIMMUNG DES CaBP UND DER CaBP-AKTIVITÄT	6
2.4.1.	Bestimmung der Aktivität des duodenalen CaBP	6
2.4.2.	Immunologische Bestimmung des CaBP	9
2.4.3.	Bewertung der CaBP- und CaBP-Aktivitätsbestimmung	10
2.5.	BILDUNG DES CaBP	11
2.6.	REGULATION DER CaBP-SYNTHESE	12
2.6.1.	Regulation auf zellulärer Ebene	12
2.6.2.	Diätetische Faktoren	13
2.6.3.	Anpassung der CaBP-Aktivität an geänderten Ca-Bedarf	14
2.6.4.	Weitere Faktoren, die das CaBP beeinflussen	14
2.7.	HEMMUNG DER VITAMIN D-WIRKUNG	15
2.7.1.	Strontium-Hemmung	15
2.7.2.	EHDP-Hemmung	17
2.8.	FUNKTION DES CaBP	17
2.8.1.	Theorien über die Funktion des CaBP	17

2.8.2.	Beziehung des intestinalen CaBP zur Ca-Absorption	18
2.9.	CaBP ALS PARAMETER DER VITAMIN D-WIRKUNG	21
2.10.	ALKALISCHE PHOSPHATASE	22

E I G E N E U N T E R S U C H U N G E N

3.	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	23
3.1.	BESTIMMUNG DER SPEZIFISCHEN AKTIVITÄT DES CaBP	23
3.1.1.	Homogenatsgewinnung	23
3.1.2.	Einengung des CaBP	23
3.1.3.	Bestimmung der CaBP-Aktivität	24
3.1.4.	Proteinbestimmung	25
3.1.5.	Berechnung der spezifischen Aktivität des CaBP	25
3.2.	BESTIMMUNG DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE IM SERUM	25
4.	<u>VERSUCHSBESCHREIBUNGEN UND ERGEBNISSE</u>	27
4.1.	KÜKENVERSUCHE	27
4.1.1.	Fütterungsversuche	27
4.1.2.	Änderung der CaBP-Aktivität nach einmaliger Applikation Vitamin D-wirksamer Substanzen	48
4.2.	FÜTTERUNGSVERSUCHE AN RATTEN	56
4.3.	KANINCHENVERSUCH	61
5.	<u>DISKUSSION</u>	63
5.1.	GESAMTERGEBNIS DER ANGESTELLTEN UNTERSUCHUNGEN	63

5.2.	EIGNUNG DER BESTIMMUNG DER CaBP- AKTIVITÄT ZUR UNTERSUCHUNG VITAMIN D- ARTIGER WIRKUNGEN	65
5.3.	VERGLEICHENDE DISKUSSION DER CaBP- AKTIVITÄTSBESTIMMUNG MITTELS IONEN- AUSTAUSCHER	67
6.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	69
7.	<u>SUMMARY</u>	71
8.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	73

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

DIRKSEN et al. (1972) ermittelten als Ursache der enzootischen Calcinose im Voralpengebiet den Verzehr von Goldhafer, *Trisetum flavescens* (T.fl.). Zuvor wurde Goldhafer als wertvolle Futterpflanze geschätzt. Er stellt das wichtigste Gras der Bergfettwiesen dar (STÄHLIN, 1969). Seither erregte er das Interesse der Vitamin D-Forschung.

Zur Darstellung der enzootischen Calcinose sei auf Zusammenfassungen mit umfassenden Quellenangaben verwiesen (DIRKSEN et al., 1974; DIRKSEN et al., 1975; WOLF, 1976; KÖHLER et al., 1978).

Durch künstliche UV-Bestrahlung von Kaninchen und Schafen, die mit T.fl. gefüttert wurden, wurde keine Steigerung der calcinogenen Wirkung erzielt (DIRKSEN et al., 1975; WOLF, 1976). Dies ließ eine Ähnlichkeit des aktiven Prinzips im Goldhafer mit Provitamin D unwahrscheinlich erscheinen.

Die große Übereinstimmung der bei T.fl.-Fütterung auftretenden pathologischen Veränderungen, mit denjenigen der Vitamin D₃-Übersorgung (CAPEN et al., 1966; PETRIE and BREEZE, 1977), ließ eine Ähnlichkeit des T.fl.-Inhaltsstoffes mit Cholecalciferol vermuten.

Aus lyophilisiertem T.fl. wurde das biologisch aktive Prinzip eingeeengt. Cochromatographische Untersuchungen zeigten dessen Verschiedenheit von 25-Hydroxycholecalciferol (25 (OH)D₃) und 1,25-Dihydroxycholecalciferol

($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) sowie eine große Ähnlichkeit mit Vitamin D_3 . Bei diesen Untersuchungen fand die HPLC-Technik Anwendung (RAMBECK und ZUCKER, 1977). Diese Resultate wurden durch kombinierte Gaschromatographie und Massenspektrometrie bestätigt. Es wurde festgestellt, daß das Vitamin D_3 in Form eines Esters vorliegt (RAMBECK et al., 1979 c).

Ergebnisse aus Tierversuchen, bei denen der Calcium-, Phosphat- und Strontium-Gehalt des Serums und der Knochenasche bestimmt wurden, unterstrichen diese Erkenntnisse (BITTNER, 1979; STARK, 1979; HASELBAUER, 1980).

Andere Autoren kamen zu abweichenden Ergebnissen. Sie fanden eine Ähnlichkeit des wirksamen Prinzips in T.fl. mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (PETERLIK et al., 1977; KÖHLER et al., 1978).

KÖHLER et al. (1978) nennen 22 I.U. Vitamin D_3 , WASSERMAN et al. (1977) nennen 0,7 I.U. Vitamin D_3 als Wirkungsäquivalent von 1 g T.fl.-Trockensubstanz. Im Unterschied dazu fanden RAMBECK et al. (1979 a) und STARK (1979) ein Wirkungsäquivalent von 3 - 4 I.U. Vitamin D_3 pro g T.fl.-Trockensubstanz.

Zur Klärung dieser Widersprüche wurde in der folgenden Arbeit die Aktivität des duodenalen calciumbindenden Proteins (CaBP) untersucht.

Das CaBP stellt bislang die einzige identifizierte Komponente des Vitamin D-induzierten Calcium-Transportsystems dar (SPENCER et al., 1978). Seine dosiskorrelierte Vitamin D-Abhängigkeit legt die Untersuchung des CaBP als Maß für die Vitamin D-Wirkung nahe.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. ENTDECKUNG DES CaBP

Durch Vitamin D₃-Gabe an rachitische Hühner wird die Calciumabsorption aus dem Darmlumen erhöht. Ebenso vergrößert sich die Fähigkeit des Homogenates duodenaler Mucosa, Calcium zu binden. Diese Fähigkeit ist erschöpfbar, bei höherem Ca-Angebot wird sie prozentual geringer. Eine Vitamin D₃-Gabe zum Homogenat bewirkte keine Steigerung des Ca-Bindungsvermögens (WASSERMAN and TAYLOR, 1963).

Die Absorptionssteigerung nach Vitamin D₃-Applikation ist durch Proteinsynthesehemmer wie Actinomycin D und Puromycin hemmbar.

Das Ca-Bindungsvermögen wird durch Erhitzen auf 86 °C, wie auch durch Inkubation mit Trypsin, zerstört. Aus diesen Eigenschaften und der Proportionalität des Ca-Bindungsvermögens zum Proteingehalt der Darmmucosa wurde geschlossen, daß das Ca an ein Protein gebunden wird, das als "Calcium Binding Protein" bezeichnet wurde (WASSERMAN and TAYLOR, 1966).

2.2. VORKOMMEN DES CaBP

CaBP wurde seither im Intestinum von Säugetieren, wie Mensch und Schwein (HITCHMAN and HARRISON, 1972), Ratte (KALLFELZ et al., 1967), Hund, Affe (WASSERMAN and CORRADINO, 1968), Rind (FULLMER and WASSERMAN, 1973), Pferd und Meerschweinchen (WASSERMAN and TAYLOR, 1974) sowie bei Amphibien und Reptilien nachgewiesen (WASSERMAN, 1975). Bei den Vögeln erwies sich das CaBP

von Truthahn, japanischer Wachtel und Huhn als immunologisch identisch (BAR et al., 1978; MUSSER et al., 1977 a; WASSERMAN and TAYLOR, 1966).

Das CaBP kommt, außer im Rectum, im gesamten Darm vor (CORRADINO, 1973). Seine Konzentration fällt vom Duodenum zum Ileum ab (TAYLOR and WASSERMAN, 1967).

Ein CaBP ist in den distalen Tubuli der Nieren lokalisiert (CONSTANZO et al., 1974). Es wurde beim Menschen (TAYLOR and WASSERMAN, 1972), Huhn (TAYLOR and WASSERMAN, 1967) und Schwein festgestellt (ARNOLD et al., 1975).

Beim Schwein ist es nicht Vitamin D-abhängig (BRUNS et al., 1978), nicht durch Strontium hemmbar (CORRADINO et al., 1971 a) und immunologisch wie auch im Molekulargewicht von dessen intestinalem CaBP verschieden (HARRISON et al., 1975 a).

Auch in den Nebenschilddrüsen von Schwein und Hund wurde ein CaBP nachgewiesen (OLDHAM et al., 1974); weiterhin in der Skelettmuskulatur von Kaninchen (BRIGGS and FLEISHMAN, 1965) und im Gehirn von Rind, Ratte (WASSERMAN and TAYLOR, 1974) und Vogel.

Ein CaBP kommt im Uterus von Ratten (BRUNS et al., 1978) und in Eischalendrüssen legender Hühner (CORRADINO et al., 1968), Truthähne und japanischer Wachteln vor (MUSSEr et al., 1977 a).

Bei den Vögeln sind uterines, intestinales, renales und cerebrales CaBP immunologisch identisch (TAYLOR, 1974).

Bei embryonalen Hühnerküken konnte CaBP bereits vom 11. Tag an in der Niere festgestellt werden (Mesonephros und Metanephros) (TAYLOR and WASSERMAN, 1972). In der Darmschleimhaut war CaBP bis zum Schlupf nicht nachweisbar (CORRADINO et al., 1971 a). In Kulturen embryonalen

Kükengewebes zeigte jedoch der gesamte Darm, mit Ausnahme des Rectums, bei Zugabe von Vitamin D die Fähigkeit, CaBP zu bilden (CORRADINO, 1973).

2.3. BISHIER ERMITTELTE CHARAKTERISTIKA CALCIUMBINDENDER PROTEINE VERSCHIEDENER SPEZIES UND GEWEBE

Das CaBP des Huhnes hat ein Molekulargewicht von 2,5 oder $2,8 \times 10^4$. Pro Molekül CaBP kann 1 Atom Ca gebunden werden. Die Bindungskonstante für Ca ist $2,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (WASSERMAN et al., 1968) oder $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (WASSERMAN and TAYLOR, 1974).

Neben den Erdalkalimetallen Ca, Sr, Barium und Magnesium können andere zweiwertige Ionen wie Zink, Cadmium, Mangan und Eisen gebunden werden.

Das CaBP des Huhnes besitzt, wie das des Schweines, keine prothetische Gruppe.

Die Aminosäurezusammensetzungen verschiedener CaBP wurden analysiert. Das intestinale CaBP des Schweines fällt durch Fehlen der Aminosäuren Histidin, Methionin, Cystein und Tryptophan auf. Im CaBP des Rindes kommt überdies Arginin nicht vor (KRAMPITZ et al., 1976; WASSERMAN et al., 1968).

Das CaBP des Hundes wird weder durch Erhitzen auf 100°C noch durch Trypsin-Digestion zerstört (WASSERMAN and TAYLOR, 1969).

Das intestinale CaBP der Säugetiere hat ein niedrigeres Molekulargewicht als das der Vögel.

Die Bestimmung des Molekulargewichts durch das Sedimentationsgleichgewicht bei der Ultrazentrifugation

und anhand von Gelfiltrationsverfahren erbrachte, wie schon beim Huhn, unterschiedliche Resultate. Es wurden Werte von 8200 und 13000 ermittelt.

Die differierenden Werte werden auf eine Asymmetrie, möglicherweise eine ellipsoidale Gestalt des CaBP-Moleküls, zurückgeführt. Dies erklärt auch die Fähigkeit des CaBP, eine Membran zu passieren, die Moleküle eines Molekulargewichts von 12400 zurückhält (DRESCHER and DELUCA, 1971 a; WASSERMAN and TAYLOR, 1974).

Bei der Ratte handelt es sich im Intestinum um zwei verschiedene CaBP gleichen Molekulargewichts und gleicher Bindungsaktivität (FREUND and BRONNER, 1975).

Das renale CaBP des Schweines hat ein Molekulargewicht von 25000 (HARRISON et al., 1975 a), das der Ratte eines von 28000 (KRAMPITZ et al., 1976).

Das Vitamin D-abhängige CaBP besitzt eine lange biologische Halbwertszeit. Es ist eine der Regenerationszeit der Nieren- und Darmepithelzellen entsprechende Zeit nach Vitamin D-Depletion in diesen Geweben nachweisbar (TAYLOR and WASSERMAN, 1972).

2.4. METHODEN ZUR BESTIMMUNG DES CaBP UND DER CaBP-AKTIVITÄT

2.4.1. Bestimmung der Aktivität des duodenalen CaBP

Allen Bestimmungsmethoden gemeinsam ist die Gewinnung duodenalen Mucosahomogenats. Homogenisiert und verdünnt wird üblicherweise die abgekratzte Duodenalschleimhaut (WASSERMAN and TAYLOR, 1966), seltener ein komplettes Stück Darm (DRESCHER and DELUCA, 1971 b;

ALLEN and HALL, 1978).

Es folgt die Einengung des CaBP. Diese kann durch Zentrifugation erfolgen (FREUND and BRONNER, 1975). Eine andere Methode zur Abtrennung inaktiver Proteine ist deren Denaturierung. Sie erfolgt durch Erhitzen (WASSERMAN and TAYLOR, 1968) oder Zufügen von Ammoniumsulfat in einer Konzentration von 0,48 g/ml (WASSERMAN et al., 1968). Anschließend werden die ausgefällten Proteine abzentrifugiert, das wasserlösliche CaBP verbleibt im Überstand.

Weitere Einengung ist durch Dialyse gegen Wasser (TAYLOR and WASSERMAN, 1965) oder Lyophilisierung mit nachfolgender Lösung möglich (FREUND and BRONNER, 1975). Zur Reinigung des CaBP wird oft die Säulenchromatographie eingesetzt. Verwendet werden Gelfiltrationsharze wie Sephadex G-100 und Bio-Gel P-60 und P-20 (WASSERMAN et al., 1968; DRESCHER and DELUCA, 1971 a). Weitere Separation kann durch Elektrophorese in Gelen erfolgen (WASSERMAN et al., 1968; SCHNEIDER et al., 1973; MUSSER et al., 1977 b).

Die vorgenannten Methoden werden auch wiederholt und kombiniert angewandt.

Die gängigste Methode der eigentlichen CaBP-Aktivitätsmessung ist, das CaBP mit einem Kationenaustauscherharz (Chelex 100, Dowex 50) um radioaktive Ca-Isotopen konkurrieren zu lassen. Verwendet wird ^{45}Ca .

Nach Durchmischung der Komponenten Chelex-Austauscherharz, CaBP- und ^{45}Ca -Lösung wird das Ionenaustauscherharz durch Zentrifugieren abgetrennt. Der Anteil an radioaktivem ^{45}Ca , der mit dem wasserlöslichen CaBP im Überstand verbleibt, wird bestimmt (WASSERMAN and TAYLOR, 1966; HARRISON et al., 1975 b).

Nicht mehr angewandt wird die Konkurrenz zwischen Präzipitat und dem Überstand von Mucosahomogenat um radioaktives Ca.

Auch Kombinationen verschiedener, z.B. rachitischer und nichtrachitischer Komponenten wurden eingesetzt. Diese Versuche erbrachten bereits eine Proportionalität zwischen dem eingesetzten Anteil an Darmmucosa Vitamin D-behandelter Tiere und dem gebundenen ^{45}Ca (WASSERMAN and TAYLOR, 1963; TAYLOR and WASSERMAN, 1965; WASSERMAN and TAYLOR, 1968).

Auch die differierenden ^{45}Ca -Bindungsvermögen zweier Homogenatsüberstände beiderseits einer semipermeablen Membran wurden verglichen (WASSERMAN and TAYLOR, 1966).

Eine Bestimmung der CaBP-Aktivität neueren Datums kombiniert die säulenchromatographische Abtrennung von CaBP mit der Aktivitätsbestimmung. Dabei wird das CaBP aus einer BioRad P-10 (HARRISON et al., 1975 b) oder Sephadex G-50 Säule (ALLEN and HALL, 1978) mittels eines Puffers eluiert, der ^{45}Ca enthält.

Die Resultate dieser Versuchsanordnung stimmen weitestgehend mit denen des Chelex-Versuchs überein (ALLEN and HALL, 1978).

Um die ermittelte CaBP-Aktivität in eine Relation zum vorhandenen, d.h. zur Bestimmung eingesetzten Protein setzen zu können, wird dieses üblicherweise nach der Lowry-Methode bestimmt (LOWRY et al., 1951). Seltener erfolgt die Messung durch Feststellung der Absorption bei 280 nm (FREUND and BRONNER, 1975).

Die Resultate der CaBP-Aktivitätsbestimmungen werden unterschiedlich errechnet und dargestellt. Der Protein-

gehalt der Proben wird teilweise in die Berechnung nicht einbezogen (HARRISON et al., 1975a). Die Angabe lautet dann z.B.: Prozent des insgesamt eingesetzten ^{45}Ca im Überstand (WASSERMAN and TAYLOR, 1966). Auch die Herstellung der Relation zwischen der Aktivität im Überstand, ausgedrückt als cpm (counts per minute), und dem Probengewicht ist möglich: $\text{cpm} \times 10^{-5}/\text{g}$ Probengewicht (BAR et al., 1975) oder $\text{cpm}/\mu\text{g}$ Probengewicht (KOWARSKI and SCHACHTER, 1975). Gebräuchlich ist jedoch, den Prozentsatz des insgesamt eingesetzten ^{45}Ca , der nicht an das Austauschharz gebunden wird, auf den Proteingehalt der Probe (mg/ml) zu beziehen (TAYLOR and WASSERMAN, 1967; WASSERMAN and TAYLOR, 1968; MUSSER et al., 1977 b). Dies, oder das Verhältnis von ^{45}Ca im Überstand zu ^{45}Ca , gebunden an Austauscherharz, wird auf das eingesetzte Protein bezogen und als spezifische Aktivität des CaBP bezeichnet (WASSERMAN et al., 1968; WASSERMAN and TAYLOR, 1968). Einige Autoren korrigieren das Resultat der Aktivitätsbestimmung um den Wert, der im Überstand ermittelt wird, wenn kein CaBP zugesetzt ist (HARRISON et al., 1975 b; DRESCHER and DELUCA, 1971 a). Diese Korrektur wird wegen Geringfügigkeit meist unterlassen.

2.4.2. Immunologische Bestimmung des CaBP

Zur Reindarstellung und Messung des CaBP werden die vorgenannten Techniken zu dessen Einengung vielfach kombiniert und wiederholt angewandt (WASSERMAN et al., 1968; DRESCHER and DELUCA, 1971 a; FREUND and BRONNER, 1975; MUSSER et al., 1977 b).

Solchermaßen gereinigtes CaBP wird Kaninchen injiziert. Nach mehrfacher Applikation kommt es zur Bildung von Antikörpern gegen das CaBP (EBEL et al., 1969). Das

von diesen Kaninchen gewonnene Antiserum wird zum immunologischen Nachweis von CaBP eingesetzt. Anwendung in der quantitativen CaBP-Bestimmung findet das Antiserum z.B. in der "Radialen Immunodiffusion". Dabei wird eine Antikörper enthaltende Agarplatte zentral mit dem zu untersuchenden CaBP-Material beschickt und anschließend inkubiert. Aus dem Durchmesser der entstehenden ringförmigen Präzipitationszone ist die Konzentration des CaBP zu errechnen (CORRADINO and WASSERMAN, 1971; CORRADINO, 1973).

2.4.3. Bewertung der CaBP- und CaBP-Aktivitätsbestimmung

Die Bestimmung des duodenalen CaBP als Parameter der Vitamin D-Wirkung ist gebräuchlich. Die Beeinflussbarkeit des intestinalen CaBP durch Vitamin D-wirksame Stoffe und diätetische Faktoren lassen den Einsatz der CaBP-Bestimmung bei vielen Fragestellungen zu. Gleichermaßen gebräuchlich ist die Bestimmung der CaBP-Aktivität. Speziell die CaBP-Aktivitätsbestimmung im Chelex-Versuch wird als Maß für die Konzentration von duodenalem CaBP angesehen (WASSERMAN and TAYLOR, 1974; MUSSER et al., 1977 b).

Auf die enge Beziehung zwischen CaBP und CaBP-Aktivität verweisen auch andere Autoren (WASSERMAN and TAYLOR, 1966; WASSERMAN et al., 1968; SCHNEIDER et al., 1973; BAR et al., 1975; FREUND and BRONNER, 1975).

Der Serumgehalt an anorganischem Phosphor kann als Parameter der Vitamin D-Wirkung bei rachitischen Tieren ebenfalls bestimmt werden. Jener Parameter reagiert auf verschiedene diätetische Faktoren insensitiver als das duodenale CaBP. Das CaBP bzw. seine Aktivität

ändert sich also deutlicher (BITTNER, 1979).

2.5. BILDUNG DES CaBP

Die Frage, ob das Erscheinen des CaBP auf eine de novo Synthese oder auf das Freisetzen aus Speichern zurückzuführen ist, wurde schon früh gestellt (WASSERMAN and TAYLOR, 1966).

Meist wird von einer Vitamin D-abhängigen CaBP-de-novo-Synthese in Intestinum, Niere, Eischalendrüse und Uterus ausgegangen (WASSERMAN and TAYLOR, 1968; BRUNS et al., 1978). Hinweise darauf erbrachten Versuche mit Proteinsynthesehemmern, wie Actinomycin D (FEHER and WASSERMAN, 1979; CORRADINO, 1973), Puromycin und Cycloheximidin (WASSERMAN and TAYLOR, 1968; KOWARSKI and SCHACHTER, 1975). Diese waren in der Lage, eine Bildung von CaBP zu verhindern. Der Einbau markierter Aminosäuren in das CaBP-Molekül bei seiner Entstehung wurde aufgezeigt (CORRADINO et al., 1971 a).

Nach derzeitiger Auffassung tritt $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, der aktive Metabolit des Vitamin D, der nach Hydroxilierung des Vitamin D in der Niere entsteht, wie ein Steroidhormon in die Darmmucosazelle ein. Es induziert, nach Bindung und Aktivierung eines Rezeptors im Cytosol und Verlagerung des Rezeptor-Hormonkomplexes zum Nukleus, die Synthese des CaBP (HAUSSLER and MC CAIN, 1977).

Die CaBP-Synthese erfolgt in freien Ribosomen. Dies ist charakteristisch für im Zellinneren vorkommende Proteine (SPENCER et al., 1978).

Elektrophoretisch wurde nachgewiesen, daß das Auftreten des CaBP nicht vom Verschwinden eines anderen Proteins

begleitet wird (TAYLOR and WASSERMAN, 1967). Die Becherzellen des Darms werden als Lokalisation von inaktivem CaBP betrachtet, als "non-functional pool", in den ein Teil der CaBP-Synthese mündet (FEHER and WASSERMAN, 1979).

Andere Autoren vermuteten das Entstehen von CaBP aus einem anderen Protein, und zwar durch Hydrolyse. Sie belegten dies durch das Verschwinden eines Proteins des Rattendarms bei parallelem Erscheinen von CaBP (DRESCHER and DELUCA, 1971 a). Bei Inkubation von Kükenembryoduodenum mit Vitamin D wurde ein Anstieg der Konzentration von CaBP bei konstanten Werten für das gesamte Protein und DNA beschrieben (CORRADINO, 1973).

2.6. REGULATION DER CaBP-SYNTHESE

2.6.1. Regulation auf zellulärer Ebene

Die Bildung von CaBP wird als spezifische Reaktion der intestinalen Mucosazelle auf $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ betrachtet (NORMAN, 1974).

Auch die intrazelluläre Konzentration von Ca reguliert die Synthese des CaBP in der Darmmucosazelle.

Das $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ besitzt also auch, durch Erhöhung des Ca-Einstroms in die Zelle, eine die CaBP-Synthese mittelbar stimulierende Wirkung (SPENCER et al., 1978; ZOLOCK et al., 1979).

Vitamin D_3 erhöht gleichfalls durch Permeabilitätssteigerung die Ca-Diffusion in die Mucosazelle (HARMEYER and DELUCA, 1969). Durch Inkubation mit Vitamin D_3 wird die Ca-, Eisen- und Phosphoraufnahme

in Kulturen von Kükenembryoduodenum vergrößert (CORRADINO, 1973).

Die Regulation des intestinalen CaBP im zellulären Bereich stellt nur ein untergeordnetes Endglied einer Kette dar. Deren Anfang bilden die Ca-Homöostasemechanismen des Körpers, speziell die renale $25\text{ (OH)}\text{D}_3\text{-}1$ alpha-Hydroxylase.

2.6.2. Diätetische Faktoren

Verringert sich der Gehalt der Nahrung an Calcium oder Vitamin D, steigt die Aktivität der $25\text{ (OH)}\text{D}_3\text{-}1$ alpha-Hydroxylase in der Niere. In der Darmmucosa erhöht sich folglich die Konzentration von CaBP und die Ca-Absorption (WASSERMAN and TAYLOR, 1974). Auch die Konzentration von $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}_3$ in der Intestinalschleimhaut nimmt zu (OHMDAHL and DELUCA, 1972; BAR et al., 1978), allerdings nur, wenn kein Mangel an Vitamin D vorliegt (WASSERMAN and TAYLOR, 1969; SPENCER et al., 1978).

Völliges Fehlen von Calcium in der Diät wirkt sich negativ auf die CaBP-Aktivität aus (HARMEYER and DELUCA, 1969).

Der Einfluß niedriger Phosphatkonzentrationen in der Nahrung ist umstritten (HARRISON et al., 1975 b; WASSERMAN and TAYLOR, 1974). Bei negativer Einwirkung auf das duodenale CaBP soll das renale CaBP gefördert werden (HARRISON et al., 1975 a).

Eine Proteinunterversorgung wirkt sich hemmend auf die CaBP-Aktivität aus. Vermutlich kommt es zu einem Mangel an zur CaBP-Synthese benötigten Aminosäuren (ALLEN and HALL, 1978).

2.6.3. Anpassung der CaBP-Aktivität an geänderten Ca-Bedarf

Eine Adaptation des CaBP an Änderungen im Ca-Bedarf findet über die zuvor erwähnten Mechanismen statt. Bei adulten Tieren verringert sich die Aktivität des intestinalen CaBP gegenüber wachsenden Tieren (Skelett-wachstum und -mineralisation) um die Hälfte (BRUNS et al., 1977; KOWARSKI and SCHACHTER, 1975; WASSERMAN and TAYLOR, 1968).

Vermehrung des intestinalen CaBP findet sich auch bei Gravidität, Laktation und Eischalenbildung. Die Ca-Absorption und der Serumspiegel von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sind gleichfalls erhöht (BRUNS et al., 1978; WASSERMAN and TAYLOR, 1974).

2.6.4. Weitere Faktoren, die das CaBP beeinflussen

Oestrogen ist in der Lage, die CaBP-Aktivität zu steigern. Dies wird nach kombinierter Oestrogen- und Vitamin D-Gabe, gegenüber der Applikation von Vitamin D allein, deutlich (WASSERMAN and TAYLOR, 1968).

Nach 24 Stunden völligen Nahrungsentzugs ist das intestinale CaBP um die Hälfte verringert. Dies wird auf die Lebensdauer der Darmepithelzellen zurückgeführt, die CaBP enthalten (BRUNS et al., 1977; SPENCER et al., 1978).

Bei Diabetes sinkt die Aktivität des intestinalen CaBP stark ab. Dies tritt auch nach artifizieller Induktion eines Diabetes, z.B. durch Applikation von Alloxan, auf. Die Verringerung der CaBP-Aktivität geht mit Auftreten der diabetischen Erscheinungen, 5 Tage post

applicationem, einher. Es besteht ein kausaler Zusammenhang mit dem Diabetes, nicht aber eine unspezifische Alloxan-Vergiftung (SCHNEIDER et al., 1973).

Von Bedeutung für die Reaktion des CaBP auf die Applikation von Vitamin D ist die vorangehende Vitamin D-Versorgung. Bei rachitischen Tieren kommt es nach der Vitamin D-Gabe zu einer Steigerung der CaBP-Konzentration in der Darmmucosa. Diese Steigerung übertrifft die Reaktion bei gleicherweise behandelten, vorher suffizient mit Vitamin D versorgten Tieren um das Dreifache (SPENCER et al., 1978).

Zu entsprechendem Überschießen kommt es nach Aufhebung einer Blockade der Vitamin D-Wirkung, z.B. nach Beendigung einer Sr-Hemmung (CORRADINO et al., 1971 b).

2.7. HEMMUNG DER VITAMIN D-WIRKUNG

2.7.1. Strontium-Hemmung

Strontium besitzt eine hohe Affinität zu CaBP. Die Bindungskonstante ist $3,9 \times 10^4 \text{M}^{-1}$, d.h. die Bindung des Sr an das CaBP ist siebenfach schwächer als die des Ca (WASSERMAN et al., 1968). Sr wird aus dem Darm-lumen quantitativ ähnlich dem Ca aufgenommen (WASSERMAN, 1962). Die Absorption aus verschiedenen Teilen des Intestinaltrakts ist abhängig von der Verweilzeit der Nahrung und der CaBP-Konzentration in der Mucosa des jeweiligen Darmabschnitts. Es ergeben sich tierartliche Unterschiede. Ratten absorbieren den größten Teil des Sr aus dem Ileum, Küken aus Duodenum und Jejunum (WASSERMAN and TAYLOR, 1969).

Wird Sr der Nahrung zugesetzt, so verringern sich die Konzentration des CaBP in der Darmschleimhaut und die Ca-Absorption (CORRADINO et al., 1971 a; WASSERMAN and TAYLOR, 1974). Die Wirkung von Vitamin D wird also gehemmt. Rachitische Erscheinungen treten auf, die durch Applikation von Vitamin D nicht kurierbar sind (SOBEL et al., 1934). Im Gegensatz zu $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}_3$ hebt auch 25 (OH)D_3 die Sr-Wirkung nicht auf, denn sie beruht auf einer Hemmung der renalen 25 (OH)D_3 - 1-alpha-Hydroxylase.

Es wurde festgestellt, daß nach Sr-Applikation in der Niere statt des $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}_3$ ein anderer Metabolit entsteht. Dieser wird auch bei hohem Ca- und $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}_3$ -Gehalt des Serums gebildet (OHMDAHL and DELUCA, 1971; OHMDAHL and DELUCA, 1972). Dieser Metabolit wurde als $24,25\text{ (OH)}_2\text{D}_3$ identifiziert (HOLICK et al., 1972).

Die Wirkung des Sr wird zum Nachweis von $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}_3$ und gleichartig wirkenden Stoffen herangezogen. Dies geschah z.B. bei der Untersuchung von *Solanum malacoxylon* (WASSERMAN, 1974; PETERLIK et al., 1976). Bei der Untersuchung von T.fl. wurde Sr nichtrachitischen Küken zusammen mit lyophilisiertem T.fl. verabreicht (WASSERMAN et al., 1977; PETERLIK et al., 1977; KÖHLER et al., 1978). Eine weitgehende Hemmung der Vitamin D-Wirkung wurde nicht beobachtet. BITTNER (1979) und HASELBAUER (1980) fütterten rachitischen Küken das Sr mit einem Ätherextrakt aus T.fl.. Sie fanden, daß dessen Vitamin D-Wirkung durch Strontium praktisch vollständig aufgehoben wird, soweit aus den untersuchten Parametern Serum-Phosphat, -Ca und -Sr zu ersehen war.

2.7.2. EHDP-Hemmung

EHDP (Äthan-1-Hydroxy-1,1-Diphosphonat), eine Organophosphonsäure, hemmt, subcutan in hohen Dosen appliziert, bei Küken und Ratten die renale $25(\text{OH})\text{D}_3$ -1-alpha-Hydroxylase. Wie nach Sr-Aufnahme wird vermehrt $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gebildet (HILL et al., 1973; BAXTER et al., 1974). Das intestinale CaBP wird verringert (BAR and HURWITZ, 1973).

Während jedoch die Wirkung des EHDP auf die intestinale Ca-Absorption durch Applikation von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aufgehoben wird, ist die Hemmung der Knochenmineralisation nicht beeinflussbar (BONJOUR et al., 1973; BAXTER et al., 1974; BONJOUR et al., 1975).

Der Mechanismus der EHDP-Hemmung ist unbekannt. Hochdosiert Kulturen von Nierentubuli zugesetzt, inhibiert EHDP die Hydroxylierung von $25(\text{OH})\text{D}_3$ nicht. Die Reduzierung der Bildung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ beruht auf Ca-Homöostasemechanismen des Körpers (TRECHSEL et al., 1976).

2.8. FUNKTION DES CaBP

2.8.1. Theorien über die Funktion des CaBP

Das Auftreten von intestinalem CaBP ist räumlich und zeitlich mit der Ca-Absorption verbunden. Dies legt die Vermutung kausaler Zusammenhänge nahe (TAYLOR and WASSERMAN, 1967). Das CaBP ist in den Membranen der Mikrovilli und Becherzellen des Darmepithels lokalisiert und besitzt eine hohe Affinität zu Ca (WASSERMAN and TAYLOR, 1974). Daraus wurde auf eine Funktion bei der Ca-Aufnahme aus dem Darmlumen und der Ca-Bindung in der Membran der Darmepithelzellen geschlossen.

Die Lösung des Ca-CaBP-Komplexes wird im Modell durch Verbindung von CaBP mit Membranbestandteilen, wie Lysolecithin, erklärt (WASSERMAN and TAYLOR, 1969). Durch Lysolecithin wird experimentell die Ca-Bindungsfähigkeit des CaBP reduziert. Auch eine Erhöhung der Membranpermeabilität durch CaBP wird diskutiert. Eine Schutzfunktion des CaBP vor zu hohen intrazellulären Ca-Konzentrationen ist möglich. Seine wesentliche Aufgabe wäre somit die Ca-Bindung in der Zelle sowie Mitwirkung bei der Ausschleusung von Ca. Die Ca-Aufnahme aus dem Darmlumen würde mittelbar gefördert. Untersuchungen, die CaBP als nicht membrangebunden zeigen, unterstützen diese Ansicht. Wie für intrazelluläre Proteine charakteristisch, wird CaBP in freien Polyribosomen gebildet und nur im Zellinneren nachgewiesen (SPENCER et al., 1978).

Die verschiedenen Ansichten über die Funktion des CaBP basieren nicht nur auf differierenden Erkenntnissen über die intrazelluläre Lokalisation des CaBP. Auch bei Untersuchungen des Verhältnisses zwischen CaBP und der Ca-Absorption waren die Resultate teilweise widersprüchlich.

2.8.2. Beziehung des intestinalen CaBP zur Ca-Absorption

Rachitischen Tieren wurde einmalig Vitamin D, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und Dihydrotachysterol (DHT) in verschiedenen Dosierungen appliziert. Die Änderungen der Parameter für CaBP und Ca-Absorption wurden verglichen. Widersprüchliche Resultate sind dabei zum Teil auf unterschiedliche Sensitivität der angewandten Untersuchungsmethoden zurückzuführen (OHMDAHL and THORNTON, 1972).

HARMEYER und DELUCA (1969) applizierten rachitischen Hühnerküken einmalig eine Dosis von 500 internationalen Einheiten (I.U.) Vitamin D_3 oral. Die Bestimmung des CaBP erfolgte über die Bestimmung seiner Aktivität. Ein Anstieg des CaBP konnte erst während der 15. bis 17. Stunde post applicationem (p.a.) festgestellt werden, während die Ca-Absorption bereits 5 Stunden vorher erhöht war. Im Rattenversuch war das CaBP von der 24. Stunde p.a. an nachweisbar. Die Differenz zur Ca-Absorption betrug 12 Stunden.

Bei Reduzierung des Ca-Gehalts der Diät wurde die Reaktionszeit der Ca-Absorption verkürzt, beim CaBP trat keine Änderung ein.

50 bis 100 Stunden p.a. steigt das CaBP weiterhin, jedoch sinkt die Ca-Absorption bereits in dieser Zeit.

Andere Untersuchungen zeigten, daß bei Küken das CaBP und die Ca-Absorption mit gleicher exponentieller Rate in dem Zeitraum vom 5. bis 10. Tag p.a. absinken (WASSERMAN and TAYLOR, 1968).

Der immunologische Nachweis von CaBP gelang bei Küken 14 Stunden nach Applikation von 100 I.U. Vitamin D_3 . Er war 4 Stunden nach Applikation von 5000 I.U. Vitamin D_3 möglich. In beiden Fällen trat gleichzeitig der Anstieg der Ca-Absorption ein.

Der Nachweis der CaBP-Aktivität gelang in der 18., respektive 14. Stunde p.a. (EBEL et al., 1969).

Von SPENCER et al. (1978) wurden Vergleiche zwischen Vitamin D_3 und $1,25 (OH)_2 D_3$ angestellt. Das CaBP wurde immunologisch bestimmt. 12 Stunden nach intrakardialer Applikation von 5 μg Vitamin D_3 wurde ein Anstieg von CaBP und Ca-Absorption festgestellt. In der 18. Stunde

p.a. erreichte die Absorption ihr Maximum und blieb bis zur 72. Stunde erhöht. Das CaBP stieg bis zur 100. Stunde p.a. weiter an. Durch intrakardiale Applikation von $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ wurde die Zeit bis zum Eintritt einer Reaktion verkürzt. Die erhöhte Ca-Absorption war bereits nach 2 bis 4 Stunden feststellbar, 5 Stunden vor dem CaBP-Anstieg. Die Ca-Absorption erreichte ihr Maximum in der 21. Stunde. In der 24. Stunde war der rachitische Ausgangswert fast wieder erreicht. Zu diesem Zeitpunkt wurde das Maximum an CaBP ermittelt.

NORMAN (1974) berichtet über eine direkte Verknüpfung des Anstiegs der Ca-Absorption und des CaBP nach oraler Gabe von $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$. Das CaBP erreichte seinen halben Maximalwert nach 9 Stunden. Dieser Wert wurde von der Ca-Aufnahme erstmals 5 Stunden, dann erneut 48 Stunden nach der Applikation erreicht. Zu diesem Zeitpunkt war das CaBP nur wenig unter den Maximalwert gesunken.

BICKLE et al. (1977) berichten, daß CaBP nach Applikation von $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ binnen 6 bis 8 Stunden in den Krypten der Darmschleimhaut, nach 24 Stunden an den Zottenspitzen nachweisbar war.

Bei Dihydrotachysterol handelt es sich um eine chemisch dem Vitamin D nahe verwandte Substanz. Der Unterschied im A-Ring des Moleküls läßt eine 1- α -OH-Ähnlichkeit entstehen (WASSERMAN, 1975).

DHT wirkt stark calcinogen. Dem Vitamin D_3 und D_2 entsprechend gibt es ein DHT_2 und DHT_3 . Das DHT_2 stellt bei Küken die wirksamere Substanz dar.

DHT ist in der Lage, die Bildung von CaBP zu induzieren. Ein Anstieg der CaBP-Aktivität war von der 10. Stunde nach intravenöser Applikation einer Dosis von 325 n mol

DHT₂ an festzustellen. Er erstreckte sich bis zur 44. Stunde. Die Ca-Absorption stieg von der 5. bis zur 20. Stunde p.a. an (OHMDAHL and THORNTON, 1972).

Es bestehen kaum noch Zweifel, daß die Ca-Resorption nicht ausschließlich CaBP-abhängig ist.

2.9. CaBP ALS PARAMETER DER VITAMIN D-WIRKUNG

Durch die Messung des CaBP lassen sich quantitative Unterschiede in der Wirksamkeit Vitamin D-artiger Substanzen feststellen.

Im Dosisbereich von 10 bis 5000 I.U. Vitamin D₃ pro Huhn besteht ein annähernd lineares Verhältnis zwischen intestinalem CaBP und dem log der Vitamin D₃-Dosis (BAR and WASSERMAN, 1974).

Eine andere Untersuchung der CaBP-Aktivität bei Dosen von 0,05 bis 500 I.U. Vitamin D₃ diente dem Vergleich von Vitamin D₃, Vitamin D₂ sowie DHT₂ und DHT₃. Bei den Küken zeigte sich, daß Vitamin D₃ die Bildung von CaBP zehnfach stärker anregt als Vitamin D₂. Bei Dosen bis 50 I.U. pro Tier entsprach die Wirkung von DHT₂ und DHT₃ der des Vitamin D₂, bei 500 I.U. der des Vitamin D₃. DHT₂ war etwas wirksamer als DHT₃ (OHMDAHL and THORNTON, 1972).

Wurden der Diät von Küken 40 µg Vitamin D₃ pro kg oder 5 µg 1-alpha-OH D₃ pro kg zugefügt, so waren das CaBP, seine Aktivität und die Ca-Absorption bei der 1-alpha-OH D₃-Gruppe höher (BAR et al., 1975). Bei legenden Wachteln erwies sich 1-alpha-OH D₃ zur Erhöhung der Konzentration des duodenalen CaBP als fünfmal wirksamer als Vitamin D₃ (BAR et al., 1976).

2.10. ALKALISCHE PHOSPHATASE

Die Alkalische Phosphatase (AP) kommt im Körper, neben der Lokalisation in Knochen und Knorpeln, in fast allen Organen vor. Neben der Leber, Niere und Prostata ist sie besonders in der duodenalen Schleimhaut nachweisbar (CORRADINO et al., 1971 a; BIKLE et al., 1977).

Die AP katalysiert im alkalischen Milieu sowohl die Synthese als auch die hydrolytische Spaltung von Phosphorsäureestern.

Diagnostisch bedeutsam ist die im Serum bestimmte AP bei Erkrankungen des Skelettsystems (KRAFT, 1964).

Die AP ist ein typisches Osteoblastenenzym. Ihre Aktivität im Serum ist bei Umbau- und Demineralisationsvorgängen des Skeletts erhöht.

Vitamin D verringert die Aktivität der Serum-AP (LAWSON, 1970). Bei Rachitis wird das Absinken der erhöhten Aktivität des Enzyms nach Vitamin D-Behandlung als Therapiekontrolle beobachtet.

Patienten mit renaler Osteodystrophie wurde $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, an dem es ihnen mangelt, appliziert. Die intestinale Ca-Absorption und die erhöhte Aktivität der Serum-AP normalisierten sich (AHMED, 1978).

Bei Kaninchen setzt mit Verfütterung von lyophilisiertem T.fl. und Solanum malacoxylon ein Abfall der Aktivität der Serum-AP ein (WOLF, 1976).

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. BESTIMMUNG DER SPEZIFISCHEN AKTIVITÄT DES CaBP

3.1.1. Homogenatsgewinnung

Das Töten der Küken und Kaninchen erfolgte durch cervicale Dislokation, die Ratten wurden durch Überdosierung von Äther eingeschläfert.

Für die Herstellung des Schleimhauthomogenats (CORRADINO et al., 1971) wurde ein ca. 10 cm langes Stück des Duodenums entnommen und in kalter physiologischer Kochsalzlösung abgekühlt. Danach wurde es ausgestreift und entlang des Gekröseansatzes aufgeschnitten.

Das Darmstück wurde nochmals in kalter physiologischer Kochsalzlösung gespült und danach abgetrocknet.

Das Abkratzen der Mucosa erfolgte auf glatter Unterlage mit Hilfe eines Objektträgers.

Die so gewonnene Schleimhaut wurde gewogen und mit kalter Trispufferlösung ($1,37 \times 10^{-2}$ M Tris HCL + $0,12$ M NaCl + $4,74 \times 10^{-3}$ M KCl + $0,01 \times 10^{-3}$ M Glucose, pH = 7,4) im Verhältnis von 1:7 (Gewicht: Volumen) verdünnt.

Zur Homogenisierung wurde ein Potter-Elvehjem Homogenisator mit Teflon Pistill verwendet.

3.1.2. Einengung des CaBP

Das Homogenat wurde anschließend 20 min. in einer gekühlten Zentrifuge (MSE) zentrifugiert ($38000 \times g$), der Überstand abdekantiert und 10 min. lang bei 60°C

in einem Wasserbad erwärmt.

Dabei wird das CaBP nicht zerstört (TAYLOR and WASSERMAN, 1965), während ca. 60 Prozent der anderen Proteine ausgefällt werden (WASSERMAN and TAYLOR, 1966).

Die denaturierten Proteine werden durch Zentrifugieren entfernt. Das wasserlösliche CaBP wird im Überstand gewonnen.

3.1.3. Bestimmung der CaBP-Aktivität

Die eigentliche CaBP-Aktivitätsbestimmung wurde als Konkurrenz des CaBP mit einem Kationen-Austauscherharz (Chelex 100, BioRad Laboratories, 200-400 mesh) um ^{45}Ca durchgeführt (WASSERMAN and TAYLOR, 1966).

Dazu wurden 90 mg Chelex in ein gläsernes Zentrifugenröhrchen eingewogen. Dem wurde zunächst 1 ml des eingengten Homogenats, danach 0,2 ml einer ^{45}Ca -Lösung (Amersham, 1 mCi ^{45}Ca /200 ml Trispuffer) unter ständigem Durchmischen auf einem Vortexgerät zugegeben. Nach 15 sec. dauerndem Mischen wurde das Chelexharz durch Zentrifugieren, 10 min. bei 3000 U/min., abgetrennt.

Vom Überstand wurden 0,2 ml in ein Zählfläschchen abpipettiert. Andere Zählfläschchen wurden mit 0,2 ml der ^{45}Ca -Lösung beschickt, um die der Probe insgesamt zugesetzte Aktivität zu bestimmen. In jedes Zählfläschchen wurden 10 ml einer Szintillationsflüssigkeit (Unisolve I, Zinsser) gefüllt und mit dem Probenmaterial kräftig durchmischt.

Die Messung der Aktivität in cpm (counts per minute) erfolgte in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Packard TRI-CARB, Mod. 3385) mit einer Messdauer von 10 min. pro Probe.

3.1.4. Proteinbestimmung

Die Messung des Proteins im Homogenat erfolgte nach der Lowry-Methode (LOWRY et al., 1951).

Zur Messung war bei Küken und Ratten eine Verdünnung von 1:51 nötig.

Die Probe wurde mit Na_2CO_3 , NaOH, CuSO_4 und $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ vermischt und nach 10 min. mit Folin's Reagenz (Folin und Ciocalteu's Phenolreagenz, Sigma, F 9252) unter Mischen auf dem Vortexgerät versetzt.

Nach 30 min. wurde die Extinction der Probe gegen einen gleichermaßen behandelten H_2O -Leerwert bestimmt. Die Messung erfolgte mit einem Photometer der Fa. Carl Zeiss bei einer Wellenlänge von 750 nm.

Die Proteinbestimmung erfolgte anhand einer Eichkurve, die mit Serum-Albumin (BSA, Fraktion V, Sigma, A 4503) erstellt worden war.

3.1.5. Berechnung der spezifischen Aktivität des CaBP

Im oben beschriebenen Versuch wurde ermittelt, wieviel Prozent der insgesamt eingesetzten Radioaktivität nicht an das Chelexharz gebunden wurden, sich also mit dem wasserlöslichen CaBP im Überstand fanden. Bezogen auf den Proteingehalt der Probe wurde dies als Maß der spezifischen Aktivität des CaBP bestimmt (TAYLOR and WASSERMAN, 1967).

3.2. BESTIMMUNG DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE IM SERUM

Die Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase im Serum erfolgte unter Verwendung einer Testkombination der Fa. Boehringer Mannheim (Best.Nr. 123889). Diese

Methode beruht auf der Umwandlung von Nitrophenylphosphat durch die alkalische Phosphatase zu Phosphat und p-Nitrophenol.

Die Messung der Extinction des p-Nitrophenol mit einem Zeiss-Photometer erfolgte bei 405 nm gegen einen Leerwert.

Um in einen innerhalb der angegebenen Verdünnungsgrenze liegenden Meßbereich zu kommen, mußten die Kükenseren vorschriftsgemäß 1:61, die Rattenseren 1:2 verdünnt werden.

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase errechnete sich nach der Formel $U/l (37^{\circ}C) = 200 \times E_{405 \text{ nm}}$ unter Berücksichtigung der Verdünnung.

4. VERSUCHSBESCHREIBUNGEN UND ERGEBNISSE

4.1. KÜKENVERSUCHE

4.1.1. Fütterungsversuche

BITTNER (1979), HASELBAUER (1980) und KREISL (in Vorbereitung) untersuchten bei anderen Individuen derselben Versuchsgruppen, die zur CaBP-Aktivitätsbestimmung herangezogen wurden, weitere Parameter der Vitamin D-Wirkung, u.a. den anorganischen Phosphor, das Ca und das Sr im Serum.

Die Zusammensetzungen der Basaldiäten in der Vor- und Versuchsperiode der hier geschriebenen Versuche sind den vorgenannten Arbeiten zu entnehmen.

Ablauf der Versuche

Die Versuchstiere, männliche Lohmann-Broiler, wurden als Eintagsküken aufgestellt und Vitamin D-depletiert. Während der Depletionsperiode (Vorperiode) wurden sie mit Vitamin D-freiem Futter versorgt.

Für die Versuchsperiode wurden Küken mittleren Gewichts mit Flügelmarken versehen. Die Tiere jeder Versuchsgruppe wurden unter Berücksichtigung der Licht- und Temperaturverhältnisse auf mehrere Käfige verteilt.

Während der Versuchsperiode wurde der Basaldiät Vitamin D₃, Vitamin D₃-Ester, 1,25 (OH)₂D₃, ein T.fl.-Ätherextrakt oder lyophilisiertes T.fl. zugesetzt, oder sie wurde allein verfüttert.

Zur Untersuchung der Sr- und EHDP-Hemmung wurden diese Hemmstoffe gruppenweise über die gesamte Versuchsperiode verabreicht.

Die verschiedenen Zusätze zur Basaldiät werden bei den einzelnen Versuchsbeschreibungen aufgeführt. Die T.fl.-Zusätze in den Versuchen I-IV bestanden aus einem Ätherextrakt, dessen antirachitische Aktivität ZUCKER et al. (1977) nachwiesen. Die Prozentangaben zum T.fl. besagen, daß dem Futter der Extrakt aus einer Menge von lyophilisiertem T.fl. zugesetzt wurde, die diesem Anteil entspricht.

Die Ergebnisse der CaBP-Aktivitätsbestimmung werden als Mittelwert der Tiere einer Gruppe angegeben. Soweit in den Tabellen nicht anders angegeben, betrug die Anzahl der Tiere pro Gruppe $n = 4$.

Tabelle 1 a

Versuch I

Vorperiode: 12 Tage; Versuchsperiode: 6 Tage

Diätvariable der Versuchsperiode

Gruppe	1	2	3	4	5	6
n Tiere						
pro Gruppe	3	4	4	4	4	4
Ca (%)	1,0	0,4	1,0	1,0	0,4	1,0
Sr (%)	-	1,32	-	-	1,32	-
EHDP (mg tgl. s.c.)	-	-	5,0	-	-	5,0
Vit. D ₃ (I.U./kg)	-	-	-	1200	1200	1200
1,25 D ₃ (µg tgl. oral)	-	-	-	-	-	-
Goldhafer- extr. (%)	-	-	-	-	-	-
CaBP-Aktivität						
$\bar{x}$	0,17	0,25	0,14	1,88	0,18	0,55

Tabelle 1 b

Diätvariable der Versuchsperiode

Gruppe	7	8	9	10	11	12
n Tiere pro Gruppe	3	4	3	4	4	3
Ca (%)	1,0	0,4	1,0	1,0	0,4	1,0
Sr (%)	-	1,32	-	-	1,32	-
EHDP (mg tgl. s.c.)	-	-	5,0	-	-	5,0
Vit. D ₃ (I.U./kg)	-	-	-	-	-	-
1,25 D ₃ (µg tgl. oral)	0,5	0,5	0,5	-	-	-
Goldhafer- extr. (%)	-	-	-	30	30	30

CaBP-Aktivität

$\bar{x}$	2,03	1,62	1,81	1,57	0,24	0,67
-----------	------	------	------	------	------	------

Tabelle 2 a

Versuch II

Vorperiode: 10 Tage; Versuchsperiode: 5 Tage

Diätvariable der Versuchsperiode

Gruppe	1	2	3	4	5
Ca (%)	1,0	0,4	1,0	0,4	1,0
Sr (%)	-	1,32	-	1,32	-
Vit. D ₃ (I.U./kg)	-	-	600	600	1200
T.fl.-Äther- extrakt (%)	-	-	-	-	-

CaBP-Aktivität

$\bar{x}$	0,21	0,15	1,35	0,24	1,83
-----------	------	------	------	------	------

Tabelle 2 b

Diätvariable der Versuchsperiode

Gruppe	6	7	8	9	10
Ca (%)	0,4	1,0	0,4	1,0	0,4
Sr (%)	1,32	-	1,32	-	1,32
Vit. D ₃ (I.U./kg)	1200	-	-	-	-
T.fl.-Äther- extrakt (%)	-	15	15	30	30

CaBP-Aktivität

$\bar{x}$	0,33	1,11	0,37	1,55	0,35
-----------	------	------	------	------	------

Tabelle 3 a

Versuch III

Vorperiode: 10 Tage, Versuchsperiode: 6 Tage

Diätvariable der Versuchsperiode

Gruppe	1	2	3	4	5
Ca (%)	1,0	0,4	0,4	1,0	0,4
Sr (%)	-	1,32	1,32	-	1,32
Vit. D ₃ (I.U./kg)	-	-	-	200	200
1,25 D ₃ (µg tgl. oral)	-	-	0,5	-	-
T.fl.-Äther- extrakt (%)	-	-	-	-	-

CaBP-Aktivität

$\bar{x}$	0,32	0,51	3,92	1,73	0,73
-----------	------	------	------	------	------

Alkalische Phosphatase

(U/l) $\bar{x}$	5685	13108	12251	6609	8976
-----------------	------	-------	-------	------	------

Tabelle 3 b

Diätvariable der Versuchsperiode

Gruppe	6	7	8	9	10
Ca (%)	1,0	0,4	1,0	0,4	1,0
Sr (%)	-	1,32	-	1,32	-
Vit. D ₃ (I.U./kg)	-	-	1200	1200	-
1,25 D ₃ (µg tgl. oral)	-	-	-	-	-
T.fl.-Äther- extrakt (%)	5	5	-	-	30

CaBP-Aktivität

$\bar{x}$	1,56	0,82	4,75	0,75	4,64
-----------	------	------	------	------	------

Alkalische Phosphatase

(U/l) $\bar{x}$	6307	8402	4471	7655	3660
-----------------	------	------	------	------	------

Tabelle 3 c

Diätvariable der Versuchsperiode

Gruppe	11	12	13	14	15
Ca (%)	0,4	1,0	0,4	1,0	0,4
Sr (%)	1,32	-	1,32	-	1,32
Vit. D ₃ (I.U./kg)	-	1800	1800	-	-
1,25 D ₃ (µg tgl. oral)	-	-	-	-	-
T.fl.-Äther- extrakt (%)	30	-	-	45	45
CaBP-Aktivität $\bar{x}$	0,66	4,00	0,64	4,24	0,66
Alkalische Phosphatase (U/l) $\bar{x}$	6353	2851	7426	2799	5532

Tabelle 4 a

Versuch IV

Vorperiode: 10 Tage; Versuchsperiode: 6 Tage

Diätvariable der Versuchsperiode

Gruppe	1	2	3	4	5
Ca (%)	1,0	-	0,8	1,0	0,4
Sr (%)	-	2,2	-	-	1,32
Vit. D ₃ (I.U./kg)	-	-	-	1200	1200
T.fl.-Äther- extrakt (%)	-	-	-	-	-
D ₃ -Palmitat- ester (aus I.U./kg)	-	-	-	-	-

CaBP-Aktivität

$\bar{x}$	0,19	0,30	0,52	3,00	0,42
-----------	------	------	------	------	------

Alkalische Phosphatase

(U/l) $\bar{x}$	8111	7787	6954	5759	9318
-----------------	------	------	------	------	------

Tabelle 4 b

Diätvariable der Versuchsperiode

Grupee	6	7	8	9	10
Ca (%)	-	1,0	0,4	-	1,0
Sr (%)	2,2	-	1,32	2,2	-
Vit. D ₃ (I.U./kg)	1200	-	-	-	-
T.fl.-Äther- extrakt (%)	-	30	30	30	-
D ₃ -Palmitat- ester (aus I.U./kg)	-	-	-	-	200

CaBP-Aktivität					
$\bar{x}$	0,50	2,43	0,34	0,51	0,66

Alkalische Phosphatase					
(U/l) $\bar{x}$	7906	5313	7263	5511	6872

Tabelle 4 c

Diätvariable der Versuchsperiode

Gruppe	11	12	13	14	15
Ca (%)	0,4	1,0	0,4	1,0	0,4
Sr (%)	1,32	-	1,32	-	1,32
Vit. D ₃ (I.U./kg)	-	-	-	-	-
T.fl.-Äther- extrakt (%)	-	-	-	-	-
D ₃ -Palmitat- ester (aus I.U./kg)	200	1200	1200	1800	1800
CaBP-Aktivität					
$\bar{x}$	0,55	2,84	0,37	4,88	0,32
Alkalische Phosphatase					
(U/l) $\bar{x}$	8247	6884	8202	4667	10001

Tabelle 5

Versuch V

Vorperiode: 15 Tage; Versuchsperiode: 5 Tage

Diätvariable der Versuchsperiode

Gruppe	1	2
n Tiere pro Gruppe	5	4
Ca (%)	0,4	1,0
Sr (%)	1,32	-
T.fl. lyo- philisiert (%)	15	15
CaBP-Aktivität $\bar{x}$	0,99	1,23

Tabelle 6

Versuch VI

Vorperiode: 13 Tage; Versuchsperiode: 6 Tage

Diätvariable der Versuchsperiode

$1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ wurde äquimolar zu 800 I.U. Vitamin D eingesetzt.

Gruppe	1	2	3	4	5	6
Ca (%)	1,0	0,4	0,4	0,4	0,4	1,0
Sr (%)	-	1,32	1,32	1,32	1,32	-
Vit. D_3 (I.U./kg)	-	-	-	800	-	800
T.fl. lyo- philisiert (%)	20	20	-	-	-	-
$1,25 \text{ D}_3$	-	-	-	-	800	-
Grünmehl (%)	-	-	20	20	20	20

CaBP-Aktivität

$\bar{x}$	3,44	0,79	0,23	0,30	4,64	0,38
-----------	------	------	------	------	------	------

Versuch I

Dieser Versuch erbrachte sehr niedrige CaBP-Aktivitäten bei Tieren, die in der Versuchsdiät keine Vitamin D-wirksamen Stoffe erhielten (Gruppe 1, Ca; Gruppe 2, Sr; Gruppe 3, EHDP).

Wurde Vitamin D_3 , $1,25 (OH)_2D_3$ oder ein T.fl.-Ätherextrakt zugefüttert, erhöhte sich die CaBP-Aktivität auf das Zehnfache (Gruppe 4, Vit. D_3 ; Gruppe 7, $1,25 D_3$; Gruppe 10, T.fl.).

Diese Vitamin D-Wirkung wurde erwartungsgemäß bei den Tieren, die Vitamin D_3 erhielten, durch einen Zusatz von Sr zur Diät völlig aufgehoben (Gruppe 5).

Die Wirkung des T.fl.-Ätherextrakts wurde durch Sr gleichfalls aufgehoben (Gruppe 11).

Die CaBP-Aktivität war bei den Tieren, die Sr und $1,25 (OH)_2D_3$ erhielten, gegenüber der nicht Sr-gehemmten Gruppe kaum erniedrigt (Gruppe 7; Gruppe 8).

Diese geringfügig niedrigere Aktivität könnte in dem geringeren Futterverzehr der Küken, die Sr und $1,25 (OH)_2D_3$ aufnahmen (BITTNER, 1979), begründet sein.

Wurde Küken EHDP appliziert, war deren CaBP-Aktivität bei Fütterung von T.fl.-Ätherextrakt und Vitamin D_3 (Gruppe 12; Gruppe 11) deutlich unter den Wert ungehemmter Tiere gesenkt.

Die Wirkung von $1,25 (OH)_2D_3$ wurde durch das Diphosphonat nicht beeinträchtigt (Gruppe 9).

Der Vergleich der CaBP-Aktivität der Küken, die im Futter den T.fl.-Ätherextrakt oder Vitamin D_3 und einen Hemmstoff der renalen 1-alpha-Hydroxylase erhielten, zeigt Übereinstimmung.

Die geringere Hemmwirkung des EHDP ist vermutlich auf

eine zu niedrige Dosierung zurückzuführen (BITTNER, 1979).

Wegen des prinzipiell gleichartigen Verhaltens der CaBP-Aktivität nach Sr- und EHDP-Hemmung wurde bei weiteren Versuchen auf die Untersuchung des CaBP bei diphosphonat-behandelten Tieren verzichtet.

Versuch II

Dieser Versuch bestätigte die Hemmung der Vitamin D-artigen Wirkung des T.fl.-Ätherextrakts durch Sr. Die CaBP-Aktivität der Sr-gehemmten Tiere wurde weder durch 15 % noch durch 30 % T.fl.-Ätherextrakt in der Diät über das Niveau der Vitamin D-frei ernährten Küken erhöht (Gruppe 8; Gruppe 10).

Die Bildung von CaBP wurde bei Küken, die 600 oder 1200 I.U. Vitamin D_3 und Sr erhielten, gleichermaßen gehemmt (Gruppe 4; Gruppe 6).

Die CaBP-Aktivität bei Tieren, deren Diät 1200 I.U. Vitamin D_3 /kg enthielt (Gruppe 5), lag deutlich über den Werten der 600 I.U. Vitamin D_3 -Gruppe (Gruppe 3). 30 % T.fl.-Ätherextrakt erhöhten die CaBP-Aktivität viel stärker als 15 % T.fl.-Ätherextrakt (Gruppe 9; Gruppe 7).

Aus der CaBP-Aktivität dieser Gruppen läßt sich dem T.fl.-Ätherextrakt eine Aktivität zuordnen, die ungefähr 3 I.U. Vitamin D_3 /g Trockensubstanz entspricht.

Dies stimmt mit den Angaben anderer Autoren überein (STARK, 1979; RAMBECK et al., 1979 a).

Versuch III

Auch bei Fütterung von 45 % T.fl.-Ätherextrakt oder 1800 I.U. Vitamin D₃ (Gruppe 15; Gruppe 13) war die CaBP-Aktivität der Sr-gehemmten Tiere nicht größer als bei den Küken, die 200 I.U. Vitamin D₃ oder 5 % T.fl.-Ätherextrakt und Sr erhielten (Gruppe 5; Gruppe 7).

Die Sr-Hemmung war insgesamt wieder sehr deutlich. Der Anstieg des CaBP mit steigendem Anteil von T.fl.-Ätherextrakt und Vitamin D₃ im Futter ist wiederum zu beobachten.

Hohe Werte der Serum-AP waren in den meisten Fällen mit niedrigen CaBP-Aktivitäten verbunden.

Die Aktivität der Serum-AP war auch bei den nur mit Ca (Gruppe 1) und bei mit Sr und 45 % T.fl.-Ätherextrakt gefütterten Tieren (Gruppe 15) relativ niedrig. Sie lag jedoch deutlich über den Werten ausreichend mit Vitamin D versorgter Tiere (Gruppe 8; Gruppe 12).

Vitamin D₃ und T.fl.-Ätherextrakt beeinflussten die Serum-AP in ihren verschiedenen Dosierungen in gleicher Weise.

1800 I.U. Vitamin D₃ und 45 % T.fl.-Ätherextrakt (Gruppe 12; Gruppe 14) senkten die Aktivität der Serum-AP deutlicher als 1200 I.U. Vitamin D₃ und 30 % T.fl.-Ätherextrakt (Gruppe 8; Gruppe 10). Die Bestimmung der CaBP-Aktivität lieferte hier weniger deutliche Resultate.

Um die Aussagekraft des Parameters Serum-AP besser ermessen zu können, wurde er im Versuch IV nochmals bestimmt.

Die Küken, deren Serum-AP bestimmt wurde, waren auch

im Versuch IV nicht mit den Tieren der CaBP-Bestimmung identisch.

Versuch IV

In diesem Versuch wurde Vitamin D_3 in Form eines Palmitatesters eingesetzt. Es hatte sich herausgestellt, daß Vitamin D_3 im T.fl. in gebundener, weniger polarer Form vorliegt (RAMBECK et al., 1979 b; RAMBECK et al., 1979 c).

Diese Verbindung ist ein Ester aus Vitamin D_3 und einer langkettigen Fettsäure.

Möglicherweise wird diese Substanz, die eine andere und stärkere Wirkung als Vitamin D_3 besitzen könnte, bei dem angewandten Extraktionsverfahren verändert oder zerstört.

Synthetisch wurde ein Ester aus Vitamin D_3 und Palmitinsäure hergestellt und einem Wirkungsvergleich mit Vitamin D_3 und T.fl.-Ätherextrakt unterzogen (HASELBAUER, 1980).

Die Dosierungen des Palmitatesters in diesem Versuch entsprechen denen des Vitamin D_3 in Versuch III.

Der Ester aus 1200 I.U. Vitamin D_3 (Gruppe 12) steigert die CaBP-Aktivität wie 1200 I.U. Vitamin D_3 (Gruppe 4) und 30 % T.fl.-Ätherextrakt (Gruppe 7). Wurde Palmitatester aus 1800 I.U. Vitamin D_3 gefüttert (Gruppe 14), so wurde eine wesentlich höhere Vitamin D-Wirkung festgestellt als bei Zugabe von 1200 I.U. Palmitatester (Gruppe 12). CaBP-Aktivität und Serum-AP erbrachten übereinstimmende Resultate.

Diese Erhöhung der Vitamin D-Wirkung wurde nach

Fütterung von Vitamin D₃ in entsprechenden Dosierungen im Versuch III nicht beobachtet.

Zusatz von Sr zur Diät hemmte die Vitamin D-Wirkung des Palmitatesters. Bei allen Dosierungen entsprachen CaBP-Aktivität und Serum-AP der mit Palmitatester und Sr gefütterten Küken (Gruppe 11; Gruppe 13; Gruppe 15) den Werten Vitamin D-depletierter Vergleichsgruppen (Gruppe 1; Gruppe 2; Gruppe 3).

Vitamin D₃ (Gruppe 4; Gruppe 5) und T.fl.-Ätherextrakt (Gruppe 7; Gruppe 8) verhielten sich wie in Versuch III.

Wurde der Versuchsdiet kein Ca, sondern 2,2 % Sr zugesetzt (Gruppe 6; Gruppe 9), so trat im Vergleich zum Zusatz von 0,4 % Ca und 1,32 % Sr in der CaBP-Aktivität keine Änderung der Hemmwirkung ein (Gruppe 5; Gruppe 8). Die Mortalität der Tiere erhöhte sich jedoch stark (HASELBAUER, 1980).

Die Serum-AP ist bei den Sr-gehemmten Tieren bei Fütterung von T.fl.-Ätherextrakt (Gruppe 8; Gruppe 9) weniger stark erhöht als bei Vitamin D₃ (Gruppe 5; Gruppe 6). Dies stimmt mit den Resultaten aus Versuch III überein. Hierbei differieren CaBP-Aktivität und Serum-AP.

Versuch V

In diesem Versuch wurde kein T.fl.-Ätherextrakt, sondern Goldhafer direkt verfüttert. Der Goldhafer lag in lyophilisierter Form vor.

Es sollte geklärt werden, ob das wirksame Prinzip im T.fl. durch die Ätherextraktion eine Veränderung

erfährt bzw. nicht in den Ätherextrakt übergeht.

Bei einer der beiden Versuchsgruppen wurde 15 % T.fl., bei der anderen dazu Sr eingesetzt.

Die Aktivität des CaBP in der ungehemmten Gruppe (Gruppe 2) entsprach der bei Tieren, die in Versuch II 15 % T.fl.-Ätherextrakt erhalten hatten (Versuch II, Gruppe 7).

Im Versuch V war der Unterschied zwischen den Sr-gehemmten (Gruppe 1) und den nicht Sr-gehemmten Tieren (Gruppe 2) weniger deutlich als in den bisherigen Versuchen.

Die CaBP-Aktivität der Sr-Gruppe (Gruppe 1) war insgesamt recht hoch. Die CaBP-Aktivität eines der Tiere lag über dem Mittelwert der ungehemmten Tiere (Gruppe 2).

Es entstand der Eindruck, die Sr-Hemmung wäre bei Einsatz von lyophilisiertem T.fl. wenigstens teilweise zu überwinden. Dies wäre ein Hinweis auf eine $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -artige Wirkung von lyophilisiertem T.fl..

Zur Klärung wurde lyophilisierter Goldhafer im nächsten Versuch in höherer Konzentration eingesetzt.

Versuch VI

Ohne Sr-Zusatz stimulierten 20 % T.fl. im Futter (Gruppe 1) die CaBP-Aktivität in deutlich höherem Maße als bei Zugabe von Sr zum lyophilisierten T.fl.

(Gruppe 2). Das CaBP der Sr-gehemmten Tiere (Gruppe 2) war jedoch im Mittel höher als das der Kontrollgruppe (Gruppe 3).

Der Grund dafür liegt in der hohen CaBP-Aktivität der

Duodenalschleimhaut eines Tieres. Die übrigen CaBP-Aktivitäten dieser Gruppe entsprechen denen Sr-gehemmter, mit Vitamin D_3 gefütterter Tiere (Gruppe 4). Auch dieser einzelne hohe Wert der CaBP-Aktivität in der Gruppe 3 liegt deutlich unter dem Mittelwert der nicht Sr-gehemmten Gruppe (Gruppe 1). Ähnliche individuelle Schwankungen waren auch in einem vorherigen Versuch bei Fütterung von Vitamin D_3 mit Sr-Zusatz (Versuch III, Gruppe 5; Gruppe 9) und bei Zusatz von T.fl.-Ätherextrakt und Sr zur Diät (Versuch III, Gruppe 7; Gruppe 15) aufgetreten. Diese Diätzusammensetzungen führten in den übrigen Versuchen jedoch bei allen Tieren zur gruppeneinheitlichen Reduzierung der CaBP-Aktivität. Daher läßt sich aus diesen Resultaten schwerlich eine $1,25 (OH)_2D_3$ -artige Wirkung von Vitamin D_3 und T.fl.-Ätherextrakt ersehen. Dies kann auch auf diesen Versuch bezogen werden.

Eine $1,25 (OH)_2D_3$ -artige Wirkung von lyophilisiertem T.fl. kann nicht bestätigt werden.

Die sehr niedrigen CaBP-Werte der nicht Sr-gehemmten Vitamin D_3 -Gruppe (Gruppe 6) stimmen mit deutlichen Symptomen von Rachitis und starken Störungen des Verhaltens bei den Tieren dieser Gruppe überein. Eine fehlerhafte Futterzusammensetzung wird vermutet.

In diesem Versuch wurde Tieren, die kein T.fl. erhielten, ein entsprechender Prozentsatz Grünmehl zugefüttert. Diesem fehlte bei Sr-Zusatz jede die Bildung von CaBP induzierende Wirkung (Gruppe 3).

4.1.2. Änderung der CaBP-Aktivität nach einmaliger Applikation Vitamin D-wirksamer Substanzen

Ablauf der Versuche

Die in diesen Untersuchungen eingesetzten männlichen Lohmann-Broilerküken wurden unter den zuvor beschriebenen Bedingungen aufgezogen.

Sie wurden jedoch über die gesamte Versuchslänge mit dem Futter der Vorperiode versorgt.

Dazu werden ihnen gruppenweise einmalig verschiedene Vitamin D-wirksame Substanzen mit der Schlundsonde appliziert.

Zeitlich gestaffelt wurden sie danach getötet und die Aktivität ihres duodenalen CaBP untersucht.

Versuchszeiten und applizierte Substanzen sind in den Tabellen aufgeführt.

Angegeben werden wiederum die Mittelwerte der CaBP-Aktivitäten der Tiere einer Gruppe (s. 3.1.5.).

Die Tiere der Kontrollgruppen erhielten nur das Futter der Vorperiode.

Tabelle 7

Änderung der CaBP-Aktivität nach Applikation von
Vitamin D₃ in freier und Esterform; Versuch VII

Depletionsperiode: 9 Tage

Die Wirkstoffe wurden in Äthanol, 20 I.U./0,1 ml, verabreicht.

Anzahl der Tiere pro Gruppe n = 4

CaBP-Aktivität

Stunden nach Applikation	20 I.U. Vitamin D ₃		Kontroll- tiere
	freies Vit.D	Palmitatester	
12	0,23	0,25	0,17
18	0,18	0,22	0,22
24	0,28	0,21	0,21
30	0,24	0,22	0,23

Tabelle 8

Änderung der CaBP-Aktivität nach Applikation von
Vitamin D₃ in freier und Esterform; Versuch VIII

Depletionsperiode: 9 Tage

Die Wirkstoffe wurden in Äthanol, 100 I.U./0,2 ml,
verabreicht.

Anzahl der Tiere pro Gruppe n = 4

CaBP-Aktivität

Stunden nach Applikation	100 I.U. Vitamin D ₃		Kontroll- tiere
	freies Vit.D	Palmitatester	
12	0,49	0,57	0,26
18	0,58	0,37	-
24	0,94	0,53	0,28
30	1,03	0,44	-

Tabelle 9

Änderung der CaBP-Aktivität nach Applikation von
1,25 (OH)₂D₃ und Vitamin D₃ in freier und Ester-
form; Versuch IX

Depletionsperiode: 15 Tage

Die Wirkstoffe wurden in Äthanol, 100 I.U./0,2 ml,
verabreicht. 1,25 (OH)₂D₃ wurde äquimolar zu 100 I.U.
Vitamin D₃ dosiert.

Anzahl der Tiere pro Gruppe n = 3

CaBP-Aktivität

Stunden nach Applikation	100 I.U. Vitamin D ₃		1,25 D ₃
	freies Vit.D	Palmitatester	
6	0,35	0,27	0,34
10	0,32	0,29	0,67
16	0,62	0,46	1,07
30	0,92	1,85	1,80

Tabelle 10

Änderung der CaBP-Aktivität nach Applikation von
Vitamin D_3 , $1,25 (OH)_2 D_3$ und einem wässrigen
Extrakt aus T.fl.; Versuch X

Depletionsperiode: 13 Tage

Vitamin D_3 lag in Äthanol 20 I.U./0,2 ml gelöst vor.
 $1,25 (OH)_2 D_3$ war, äquimolar zu 20 I.U. D_3 , in 0,2 ml
Äthanol gelöst. Beide Lösungen wurden zur Applikation
1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt.

Aus lyophilisiertem T.fl. wurde ein wässriger Extrakt
hergestellt, eingengt und pro Dosis der Extrakt aus
5 g T.fl. in 1 ml destilliertem Wasser aufgenommen.

Anzahl der Tiere pro Gruppe $n = 3$

CaBP-Aktivität

Stunden nach Applikation	20 I.U. Vitamin D_3	$1,25 D_3$	T.fl.- Extrakt
10	0,21	0,65	0,22
16	0,44	0,86	0,42
30	0,45	0,49	0,32

Kontrolltiere hatten eine CaBP-Aktivität von $\bar{x} = 0,26$.

Versuch VII

Es sollte verglichen werden, in welcher Zeitspanne nach Applikation von Vitamin D₃ oder eines Palmitatesters eine Wirkung in Form eines Anstiegs der CaBP-Aktivität nachweisbar ist.

Zu diesem Zweck wurden rachitischen Tieren 20 I.U. Vitamin D₃ in freier Form oder als Palmitatester mit der Schlundsonde appliziert.

12, 18, 24 und 30 Stunden nach der Applikation wurden die Tiere getötet.

In dem Bestreben, geringe Wirkungsunterschiede möglicherweise deutlicher darstellen zu können, wurden die Dosierungen relativ niedrig gewählt.

Weder 20 I.U. Vitamin D₃ noch die entsprechende Dosis Palmitatester waren in der Lage, die CaBP-Aktivität im Untersuchungszeitraum über den Wert der Kontrollgruppe zu erhöhen.

Im nächsten Versuch wurden daher die gleichen Wirkstoffe in höherer Dosierung eingesetzt.

Versuch VIII

Die CaBP-Aktivitäten, die 12 Stunden nach Applikation der Wirkstoffe gemessen wurden, sind höher als die bei den Kontrolltieren festgestellten.

100 I.U. Vitamin D₃ und der Palmitatester verhalten sich hierbei gleichartig.

Bei den Tieren der Vitamin D₃-Gruppe stieg die CaBP-Aktivität über den gesamten Messzeitraum weiter an, während sich bei der Palmitatestergruppe keine weitere Änderung ergab.

Der nächste Versuch dieser Art sollte die Resultate aus Versuch VIII prüfen. Gleichzeitig wurde $1,25 \text{ (OH)}_2\text{D}_3$ als weitere Substanz in den Wirkungsvergleich einbezogen.

Versuch IX

Da sich gezeigt hatte, daß bereits 12 Stunden nach der Applikation ein Anstieg der CaBP-Aktivität stattgefunden hatte, wurden die Untersuchungszeitpunkte verändert. Sie wurden auf 6, 10, 16 und 30 Stunden p.a. festgelegt.

Auf Kontrollgruppen wurde in diesem Versuch verzichtet. Die Dosierungen der Wirkstoffe aus Versuch VIII wurden beibehalten, $1,25 \text{ (OH)}_2\text{D}_3$ wurde äquimolar zum Vitamin D_3 eingesetzt.

Eine Erhöhung der CaBP-Aktivität trat bei der Vitamin D_3 -Gruppe erst nach der 10. Stunde p.a. ein. 16 Stunden nach der Applikation war der Wert deutlich erhöht. Die Resultate aus Versuch VIII wurden bestätigt.

10 Stunden nach Applikation des Palmitatesters zeigte sich noch keine Vitamin D-artige Wirkung. Eine leicht gestiegene CaBP-Aktivität war in der 16. Stunde p.a. vorhanden. Im Gegensatz zu Versuch VIII zeigte sich aber 30 Stunden p.a. eine sehr hohe CaBP-Aktivität, die Wirkung von Vitamin D_3 wurde deutlich übertroffen.

Im Unterschied zu den vorgenannten Gruppen war bei den Tieren, denen $1,25 \text{ (OH)}_2\text{D}_3$ eingegeben wurde, ein Anstieg der CaBP-Aktivität schon in der 10. Stunde p.a. feststellbar. $1,25 \text{ (OH)}_2\text{D}_3$ und der Palmitatester

erzielten in der 30. Stunde p.a. übereinstimmende Wirkungen.

Versuch X

Nunmehr sollte ein wässriger T.fl.-Extrakt dem Vergleich mit Vitamin D_3 und $1,25 (OH)_2D_3$ unterzogen werden.

Einerseits sollten die Küken nicht durch ein zu großes Volumen der zu applizierenden Substanz überbeansprucht werden. Andererseits stellt die Technik der Applikation mit der Schlundsonde gewisse Anforderungen an die Viskosität der Substanz. Deshalb wurde für jede Dosis ein wässriger Extrakt aus 5 g lyophilisiertem T.fl. hergestellt, eingeengt und in 1 ml H_2O aufgenommen.

Zum besseren Wirkungsvergleich wurde für die anderen Gruppen die Vitamin D_3 -Dosis entsprechend auf 20 I.U. bzw. $1,25 (OH)_2D_3$ äquimolar zu 20 I.U. Vitamin D_3 reduziert.

Der Messzeitpunkt 6 Stunden p.a. wurde gestrichen, da so kurz nach der Applikation der Wirkstoffe bisher der Nachweis eines Anstiegs der CaBP-Aktivität nicht möglich war.

Der wässrige T.fl.-Extrakt bewirkte, wie Vitamin D_3 , in der 16. Stunde einen geringen Anstieg der CaBP-Aktivität. Eine weitere Steigerung trat bei beiden Versuchsgruppen bis zur 30. Stunde p.a. nicht mehr auf.

Bei den Küken der $1,25 (OH)_2D_3$ -Gruppe war wiederum 10 Stunden p.a. die CaBP-Aktivität deutlich über den

Wert der Kontrolltiere gesteigert. Bis zur 16. Stunde fand ein weiterer Anstieg statt. Der niedrige CaBP-Wert der Tiere, denen $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ 30 Stunden vor der Bestimmung eingegeben wurde, kann nicht gedeutet werden.

Insgesamt scheint bei derartigen Versuchen die Wahl höherer als der eingesetzten Dosierungen angezeigt. Die einmalige orale Applikation von 500 I.U. Vitamin D_3 wird mehrfach beschrieben (WASSERMAN and TAYLOR, 1968; HARMEYER and DELUCA, 1969; WASSERMAN and TAYLOR, 1974).

4.2. FÜTTERUNGSVERSUCHE AN RATTEN

Vorbemerkung

Die Tiere, deren CaBP-Aktivität untersucht wurde, wurden von STARK (1979) zur Bestimmung des anorganischen Serumphosphats herangezogen.

Die Wirksamkeit verschiedener T.fl.-Pflanzenteile wie auch die Auswirkungen der UV-Bestrahlung des T.fl. sollten untersucht werden.

Genauere Informationen zur Haltung und Fütterung der Ratten, wie auch zur Zusammensetzung der Diäten und der Gewinnung ihrer Bestandteile, sind der genannten Arbeit zu entnehmen.

An dieser Stelle sei der Versuchsaufbau kurz zusammengefaßt.

Ablauf der Versuche

Die verwendeten männlichen Sprague-Dawley Ratten erhielten während einer dreiwöchigen Vorperiode ein rachitogenes Futter. Dieses bestand aus zwei verschiedenen Vordiaten.

Anschließend wurde für zirka 3 Tage ein Testfutter verabreicht. Das T.fl.-Untersuchungsgut wurde als Lyophilisat oder als angereicherter Extrakt zugegeben. Zur Gewinnung des angereicherten Extrakts wurde eine Ätherextraktion, Verseifung, dreifache säulenchromatographische Auftrennung und Hochdruckflüssigkeitschromatographie durchgeführt.

Der Diät anderer Tiere wurde Vitamin D₃ oder DHT zugefügt. Kontrolltiere erhielten das Testfutter ohne Zusatz.

Als Resultate werden die Ergebnisse der Bestimmung der CaBP-Aktivität angegeben (s. 3.1.5.).

Tabelle 11

Bestimmung der CaBP-Aktivität nach Fütterung von Vitamin D₃ und T.fl.; Versuch XI

Anzahl der Tiere pro Gruppe n = 3

Zusatz zum Testfutter	CaBP-Aktivität
Kein Zusatz	0,14
400 I.U. Vitamin D ₃ /kg	0,37
9 % T.fl.-Wurzeln	0,33
9 % T.fl. geerntet am 18.05.78	0,99
9 % T.fl. geerntet am 20.06.78	0,84

Tabelle 12

Vergleich der CaBP-Aktivität nach Fütterung von
Vitamin D₃ und angereichertem T.fl.-Extrakt; Versuch XII

Anzahl der Tiere pro Gruppe n = 4

Zusatz zum Testfutter	CaBP-Aktivität
Kein Zusatz	0,22
400 I.U. Vitamin D ₃ /kg	0,68
Angereicherter T.fl.-Extrakt aus T.fl.-Blättern entsprechend 9 %	0,64
Angereicherter T.fl.-Extrakt entsprechend 9 %	0,73

Tabelle 13

Bestimmung der CaBP-Aktivität und Serum-AP nach
Fütterung von T.fl.; Versuch XIII

Anzahl der Tiere pro Gruppe n = 6

Zusatz zum Testfutter	CaBP-Aktivität	Alkalische Phosphatase
Kein Zusatz	0,28	199,3
9 % T.fl.	1,07	180,2

Tabelle 14

Untersuchung der CaBP-Aktivität nach Fütterung von
UV-bestrahltem T.fl., nicht UV-bestrahltem T.fl.
und DHT; Versuch XIV

Anzahl der Tiere pro Gruppe n = 6

Zusatz zum Testfutter	CaBP-Aktivität
6 % T.fl., UV-frei angebaut	0,51
6 % T.fl., angebaut bei künstlicher UV-Bestrahlung	0,95
80000 I.U. DHT/kg	1,62

Versuch XI

Der Versuch ergab, daß die CaBP-Aktivitätsbestimmung zur Untersuchung der Vitamin D-Wirkung verschiedener T.fl.-Chargen geeignet ist.

Bei Zusatz von T.fl.-Wurzeln zur Diät erhöht sich die CaBP-Aktivität wesentlich weniger, als bei Verfütterung der gesamten Pflanze.

Versuch XII

Bei Zusatz des angereicherten Extrakts zur Diät konnte bestätigt werden (STARK, 1979), daß 9 % T.fl.-Blätter in der Wirkung 400 I.U. Vitamin D₃ bezüglich der

Steigerung der CaBP-Aktivität nahekommen.

Der Extrakt aus der gesamten T.fl.-Pflanze erwies sich allerdings in der Anregung der CaBP-Aktivität als noch wirksamer.

Versuch XIII, Versuch XIV

T.fl., das ohne jede UV-Bestrahlung angebaut worden war, zeigte deutlich geringere Vitamin D-Wirkung als künstlich UV-beleuchtetes T.fl..

Unter künstlicher UV-Bestrahlung gewachsener Goldhafer regte die CaBP-Aktivität stärker an als T.fl., das im Freien angebaut worden war. Hierin stimmen auch die Ergebnisse der Bestimmung des anorganischen Serum-Phosphors mit der CaBP-Aktivitätsbestimmung überein.

STARK (1979) diskutiert als Ursache hierfür den höheren Blattanteil bei künstlich UV-bestrahlten Pflanzen.

Die stärkste Anregung der CaBP-Aktivität verursachte die Zugabe von 80000 I.U. DHT zum Testfutter.

Ein direkter Vergleich zum Vitamin D₃ ist durch die differierenden Werte nach dessen Applikation (Versuch XI, Versuch XII) schwierig.

Auch bei rachitischen Ratten wird durch Fütterung von T.fl. die Serum-AP gesenkt.

4.3. KANINCHENVERSUCH

Vorbemerkung

An den Kaninchen, deren CaBP-Aktivität bestimmt wurde, untersuchte STRÖHLE (DISSERTATION in Vorbereitung) pathologisch-anatomische Veränderungen und Serumparameter der Vitamin D-Wirkung.

Einzelheiten zur Aufzucht, Haltung und Fütterung sowie zur Zusammensetzung der Basaldiät sind der erwähnten Arbeit zu entnehmen.

Ablauf des Versuchs

Die Kaninchen wurden mit einer Diät aufgezogen, die Vitamin D in physiologischer Menge enthielt.

Für den Fütterungsversuch wurden Wurfgeschwister gleichmäßig auf die Versuchsgruppen verteilt.

Während des Fütterungsversuchs wurde die Basaldiät beibehalten. Sie wurde entweder unverändert oder mit einem Zusatz von Vitamin D₃ oder Palmitatester aus Vitamin D verfüttert. Zugesetzt wurden 25000 I.U. Vitamin D₃ pro kg Futter als Ester oder in freier Form.

Tabelle 15

Untersuchung der CaBP-Aktivität nach Fütterung von
Vitamin D₃ in freier und Esterform an Kaninchen;
Versuch XV

Anzahl der Tiere pro Gruppe n = 4

Zusatz zur Basaldiät	CaBP-Aktivität
Kein Zusatz	4,30
25000 I.U. Vitamin D ₃ /kg	6,03
25000 I.U. Vitamin D ₃ als Palmitatester/kg	6,01

Versuch XV

Es zeigte sich, daß ein Zusatz von 25000 I.U. Vitamin D₃ pro kg Futter bei ausreichend mit Vitamin D versorgten Kaninchen die Aktivität des duodenalen CaBP erhöht.

Die Zugabe von Palmitatester, hergestellt aus derselben Menge Vitamin D, bewirkte einen gleichartigen Anstieg der CaBP-Aktivität.

Ein Unterschied in der Wirkung ist nicht festzustellen. Dies war von Interesse, nachdem Vitamin D₃ in T.fl. in Esterform festgestellt und eine stärkere Wirkung des Esters vermutet worden war.

5. DISKUSSION

5.1. GESAMTERGEBNIS DER ANGESTELLTEN UNTERSUCHUNGEN

Die Fütterungsversuche an Küken und Ratten bestätigten, daß lyophilisiertes T.fl. und ein T.fl.-Ätherextrakt die Fähigkeit besitzen, die Bildung des duodenalen CaBP zu induzieren, wie dies schon PETERLIK et al. (1977) und WASSERMAN et al. (1977) für lyophilisierten Goldhafer gezeigt hatten.

Der Ätherextrakt aus 1 g lyophilisiertem T.fl. erzielt, bezogen auf die CaBP-Bildung, ungefähr die Wirkung von 3-4 I.U. Vitamin D₃. Dies stimmt mit den Angaben anderer Autoren überein (RAMBECK et al., 1979 a; STARK, 1979). Dieses Ergebnis steht jedoch im Widerspruch zu den Resultaten von KÖHLER et al. (1978), die 22 I.U. Vitamin D₃ als Wirkungsäquivalent von 1 g T.fl. nennen. Eine andere Schätzung gibt eine Aktivität von ungefähr 0,7 I.U. Vitamin D₃ pro g T.fl. an (WASSERMAN et al., 1977). Die von WASSERMAN et al. (1977) untersuchte Probe war luftgetrockneter Goldhafer in fortgeschrittenem Vegetationsstadium, so daß die geringe Aktivität nicht überrascht. Die außerordentlich hohe Aktivität, über die KÖHLER et al. (1978) berichten, scheint auf Testung in einem Meßbereich zu beruhen, in dem keine Linearität mehr vorliegt.

Soweit aus der Bestimmung der CaBP-Aktivität zu ersehen ist, scheint das wirksame Prinzip in T.fl. durch die Ätherextraktion qualitativ weder beeinträchtigt noch in seiner Wirkung verändert zu werden. Der Einsatz von lyophilisiertem T.fl. oder des Ätherextrakts erbrachte

weitestgehend übereinstimmende Resultate.

Nachdem der Inhaltsstoff von T.fl. als ein noch nicht näher definierter Fettsäureester von Vitamin D₃ erkannt worden war, wurde ein langkettiger Vitamin D₃-Ester in die Versuche einbezogen. Der verfütterte Vitamin D-Palmitatester entsprach in der Wirkungsstärke und der Hemmbarkeit seiner Vitamin D-Wirkung völlig dem Vitamin D₃. Fütterungsversuche mit Kühen und Kaninchen erbrachten diesbezüglich übereinstimmende Resultate.

Auch bei Kaninchen konnte deutlich eine Vitamin D-abhängige CaBP-Aktivität nachgewiesen werden. Soweit aus den Versuchen zu ersehen ist, weicht der Vitamin D-Ester in der so gemessenen Wirkung nicht von Vitamin D₃ ab.

Die Vitamin D-Wirkung von T.fl. wird durch Hemmstoffe der renalen 1-alpha-Hydroxylase praktisch völlig aufgehoben. Die gegenüber Sr geringere Hemmwirkung von EHDP ist auf zu niedrige Dosierung zurückzuführen.

Eine 1,25 (OH)₂D₃-artige Wirkung von T.fl., wie PETERLIK et al. (1977) sie festgestellt haben, erscheint somit unwahrscheinlich. Das Vorhandensein einer 1,25 (OH)₂D₃-artigen Wirkung in sehr geringem Verhältnis zum gesamten Vitamin D-Gehalt der Pflanze (WASSERMAN et al., 1977) kann, wegen der möglicherweise zu geringen Sensitivität der angewandten Methode zur Bestimmung der CaBP-Aktivität, nicht ganz ausgeschlossen werden. Selbst durch sehr hohe Dosen von T.fl.-Ätherextrakt, bis zu 45 % Blattäquivalent, konnte die Sr-Hemmung in unserer Versuchsanordnung jedoch nicht überwunden werden.

Insgesamt verdient auch die Anmerkung von KÖHLER et al. (1978) Beachtung, alle Untersuchungsergebnisse könnten sich jeweils nur auf eine bestimmte T.fl.-Charge beziehen.

Die Untersuchung der CaBP-Aktivität, in Abhängigkeit von der Zeit nach Applikation Vitamin D-wirksamer Stoffe, bestätigte einen Unterschied zwischen dem wirksamen Prinzip im T.fl. und $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$. Vitamin D_3 , der Vitamin D-Palmitatester und der wässrige T.fl.-Extrakt bewirkten etwa gleichzeitig die Erhöhung der CaBP-Aktivität, während sie nach Applikation von $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ wesentlich früher eintrat.

Die Resultate anderer Autoren bezüglich des zeitlich verschobenen Wirkungseintritts nach Vitamin D- und $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ -Applikation konnten damit bestätigt werden (HARMEYER and DELUCA, 1969; EBEL et al., 1969; WASSERMAN and TAYLOR, 1974; SPENCER et al., 1978).

Teilweise differieren die Angaben bezüglich des absoluten Zeitpunkts des CaBP-Anstiegs. Diese Differenzen können auf unterschiedlichen Sensitivitäten der angewandten Untersuchungsmethoden beruhen (EBEL et al., 1969). Auch die Untersuchungszeitpunkte und der Ca-, P- und Vitamin D-Versorgungsstatus der Versuchstiere waren unterschiedlich.

5.2. EIGNUNG DER BESTIMMUNG DER CaBP-AKTIVITÄT ZUR UNTERSUCHUNG VITAMIN D-ARTIGER WIRKUNGEN

Die Bestimmung der CaBP-Aktivität erbrachte bei den meisten Fragestellungen brauchbare und eindeutige Resultate. Diese stimmten mit anderen Parametern der Vitamin D-Wirung,

wie anorganischem Phosphat, Ca, Sr, und der AP im Serum, weitgehend überein (BITTNER, 1979; STARK, 1979; HASELBAUER, 1980). Niedrige CaBP-Aktivität ist also mit hohen Werten für Serum P und Serum-AP verbunden, alles Kennzeichen der Rachitis. Das Serum Ca ist vielfachen Homöostasemechanismen unterworfen, daher weniger aussagekräftig.

Tabelle 16

Vergleich verschiedener Parameter der Vitamin D-Wirkung

Parameter der	Zusatz zur Diät				
	1,25 D ₃ + Sr	1800 I.U.D ₃	1800 I.U.D ₃ + Sr	45 % T.fl.- Extr.	45 % T.fl.- Extr.+ Sr
$\bar{x}$ Serum P (mg/100 ml)	5,28	4,66	6,61	5,09	6,23
$\bar{x}$ Serum Ca (mg/100 ml)	9,04	11,46	8,27	11,21	9,67
$\bar{x}$ Serum Sr (mg/100 ml)	14,49	-	8,46	-	4,15
Alk. Phos. (U/l)	12251	2851	7426	2799	5532
CaBP-Akt.	3,92	4,00	0,64	4,24	0,66

(nach HASELBAUER, 1980)

Die Bestimmung der CaBP-Aktivität übertraf die der anderer Parameter jedoch zum Teil in der Sensitivität (Versuch II). Es bestand z.B. eine deutlichere Beziehung der Dosierung Vitamin D-wirksamer Stoffe zum CaBP als zu den Serumwerten.

Insbesondere spiegelte sich die Sr-Hemmung in der CaBP-Aktivität eindeutig wider.

Die beschriebene Untersuchung der CaBP-Aktivität ermöglichte bei Küken, Ratten und Kaninchen Wirkungsvergleiche und Versuche zur Wirkungshemmung bei Vitamin D₃, 1,25 (OH)₂D₃, DHT, Palmitatester aus Vitamin D, lyophilisiertem T.fl. sowie wässrigem und Ätherextrakt aus T.fl..

Die Beweiskraft der CaBP-Aktivitätsbestimmung kann durch Erhöhung der Anzahl untersuchter Tiere pro Gruppe gesteigert werden.

5.3. VERGLEICHENDE DISKUSSION DER CaBP-AKTIVITÄTSBESTIMMUNG MITTELS IONENAUSTAUSCHER

Neben den Vorteilen, wie Reproduzierbarkeit, relativ großer Sensitivität sowie einfacher Interpretierbarkeit der Resultate, besitzt diese Methode der Bestimmung der CaBP-Aktivität einige Nachteile. Zunächst ist sie zeitlich sehr aufwendig. Dies resultierte in der Untersuchung kleiner Tierzahlen pro Versuchsgruppe. Die Beweiskraft der Ergebnisse wird dadurch erheblich eingeschränkt. Individuelle Schwankungen haben starken Einfluß.

Wegen des großen zeitlichen Aufwands bei der Bearbeitung

der einzelnen Proben in den verschiedenen Arbeitsgängen werden die Proben zeitlich ungleich behandelt. Zwischenlagerungen sind nötig.

Die Versuchstiere müssen zur CaBP-Aktivitätsbestimmung getötet werden. Verlaufsuntersuchungen müssen an verschiedenen Tieren vorgenommen werden.

Nach Töten jedes Tieres muß sofort die Herstellung des Mucosahomogenats erfolgen. Selbst bei eisgekühlter Lagerung exzidiierter Darmabschnitte in Trispufferlösung tritt in kurzer Zeit Autolyse ein. Die Gewinnung der Mucosa und die CaBP-Aktivitätsbestimmung werden dann unmöglich.

Nachteilig ist auch die mögliche Beeinflussung der CaBP-Aktivität durch Fasten der Tiere.

Für die angewandte Methode spricht, daß zu ihrer Durchführung keine speziellen Gerätschaften und, abgesehen von den Arbeiten mit radioaktiven Materialien im Isotopenlabor, keine besonderen Einrichtungen erforderlich sind. Die benötigten Materialien können problemlos jederzeit bereitgehalten werden. Diese Unkompliziertheit stellt einen Vorteil gegenüber der serologischen CaBP-Bestimmung und anderen Methoden zur Einengung des CaBP dar.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Vitamin D bewirkt über seinen Metaboliten $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}$ die Bildung von calciumbindendem Protein (CaBP) in der Darmmucosa.

Um die Vitamin D-artige Aktivität des Grases *Trisetum flavescens* näher zu charakterisieren, wurde sein Einfluß auf die CaBP-Bildung im Vergleich mit verschiedenen Vitamin D-wirksamen Verbindungen an Küken und Ratten untersucht, und zwar auch in Gegenwart von Hemmstoffen der renalen $1\text{-}\alpha\text{-Hydroxylase}$. Gleichzeitig wurde die Aktivität der Alkalischen Phosphatase im Serum gemessen.

Trisetum flavescens, lyophilisiert oder als Äther-extrakt verabreicht, bewirkt bei Vitamin D-depletierten bzw. rachitischen Küken einen ähnlichen Anstieg des CaBP wie Cholecalciferol, $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}_3$ und Dihydro-tachysterol.

Ein solcher Anstieg fehlt hingegen bei gleichzeitiger Verabreichung von Strontium oder EHDP. In Gegenwart dieser Hemmstoffe führt allein $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}_3$ zur CaBP-Bildung. Auch die Aktivität der Alkalischen Phosphatase spricht gegen ein Überwinden der Hydroxylase-hemmung durch *Trisetum flavescens*.

Nach einmaliger Gabe von T.fl., D_3 -Palmitat, Vitamin D_3 und $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}_3$ steigt CaBP bei $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}_3$ wesentlich früher an als bei den drei anderen Substanzen.

Diese Ergebnisse sprechen für das Vorliegen einer

cholecalciferolartigen Verbindung in *Trisetum flavescens* und gegen eine 1,25 (OH)₂D-artige Wirkung des Goldhafers.

7. SUMMARY

Assessment of the Activity of Duodenal Calcium-binding Protein as a Parameter of Vitamin D-like Action

Vitamin D induces the synthesis of calcium-binding protein (CaBP) in the intestinal mucosa by means of its metabolite $1,25 (\text{OH})_2\text{D}$.

In order to characterize the vitamin D-like action of the grass *Trisetum flavescens* its influence on the formation of calcium-binding protein in chicks and rats was investigated. Comparison was instituted with various compounds of the vitamin D-family in the absence or presence of inhibitors of the renal 1- α -hydroxylases. Serum alkaline phosphatase was measured simultaneously.

Trisetum flavescens, lyophilized or as a diethylether extract, led to a similar rise in CaBP-activity as was caused by cholecalciferol, $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ or dihydrotachysterol.

Such a rise in CaBP-activity did not occur after the application of dietary Sr or EHDP. In the presence of these inhibitors only $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ caused an elevation of CaBP-activity.

After a single dose of *Trisetum flavescens*, D_3 -palmitate, vitamin D or $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$, the elevation of the CaBP-activity occurs more rapidly in the case of $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ compared to the other three substances.

These results indicate a cholecalciferol-like substance

in *Trisetum flavescens* and they are strong evidence against a 1,25 (OH)₂D-like action.

8. LITERATURVERZEICHNIS

AHMED, K.Y. (1978)

Vitamin D-Fraktion lindert Osteodystrophie.
Praxis-Kurier 25, 28

ALLEN, L.H. and T.E. HALL (1978)

Calcium metabolism, intestinal calcium-binding protein, and bone growth of rats fed high protein diets.
J. Nutr. 108, 967-972

BAR, A. and S. HURWITZ (1973)

Bone ash and duodenal calcium-binding protein in chicks treated with EHDP.
Poultry Sci. 52, 2338-2339

BAR, A. and R.H. WASSERMAN (1974)

Duodenal calcium-binding protein in the chick: a new bioassay for vitamin D.
J. Nutr. 104, 1202-1207

BAR, A., S. HURWITZ, S. EDELSTEIN (1975)

Response of renal calcium-binding protein independent of kidney D₃-hydroxylation.
Biochimica et Biophysica Acta 411, 106-112

BAR, A., U. EISENER, G. MONTECUCCOLI, S. HURWITZ (1976)

Regulation of intestinal calcium-absorption in laying quail: independent of kidney vitamin D hydroxylation.
J. Nutr. 106, 1336-1342

- BAR, A., D. DUBROV, U. EIZNER, S. HURWITZ (1978)
Calcium-binding protein and kidney 25 OH D₃-
1 (OH)ase activity in turkey poults.
J. Nutr. 108, 1501-1507
- BAXTER, L.A., H.F. DELUCA, J.-P. BONJOUR, H.A. FLEISCH
(1974)
Inhibition of vitamin D metabolism by ethane-1-
hydroxy-1, 1-diphosphanate.
Arch. Biochem. Biophys. 164, 655-662
- BIKLE, D.D., R.N. EMPSON Jr., R.H. HERMAN, R.L. MORRISSEY,
D.R. ZOLOCK (1977)
Effect of 1-25 D₃ on distribution of alkaline
phosphatase activity along chick intestinal villus.
Biochimica et Biophysica Acta 499, 61-66
- BITTNER, P. (1979)
Vergleichende Untersuchungen von Trisetum flavescens,
Cholecalciferol und 1,25-Dihydroxycholecalciferol
an Hühnerküken.
Vet. Med. Diss., München
- BONJOUR, J.-P., H.F. DELUCA, H. FLEISCH, U. TRECHSEL,
L.A. MATEJOWEC, J.L. OHMDAHL (1973)
Reversal of the EHDP inhibition of calcium absorption
by 1,25 D₃.
Europ. J. Clin. Invest. 3, 44-48
- BONJOUR, J.-P., U. TRECHSEL, H. FLEISCH, R. SCHENK,
H.F. DELUCA, L.A. BAXTER (1975)
Action of 1,25 D₃ and a diphosphonate on calcium-
metabolism in rats.
Am. J. Physiol. 229, 402-408

- BRIGGS, F.N. and M. FLEISHMAN (1965)
Calcium-binding by particle-free supernatants of
homogenates of skeletal muscle.
J. Gen. Physiol. 49, 131-135
- BRUNS, M.E.H., E.B. FLESHER, L.V. AVIOLI (1977)
Control of vitamin D-dependent calcium-binding
protein in rat intestine by growth and fasting.
J. Biol. Chem. 252, 4145-4150
- BRUNS, M.E.H., A. FAUSTO, L.V. AVIOLI (1978)
Placental calcium-binding protein in rats.
J. Biol. Chem. 253, 3186-3190
- CAPEN, C.C., C.R. COLE and J.W. HIBBS (1966)
The pathology of hypervitaminosis in cattle.
Path. vet. 3, 350-378
- CONSTANZO, L.S., P.R. SHEEHE, I.M. WEINER (1974)
Renal actions of vitamin D in vitamin D-deficient
rats.
Am. J. Phys. 226, 1490-1495
- CORRADINO, R.A., R.H. WASSERMAN, M.H. PUBOLS,
S.J. CHANG (1968)
Vitamin D₃ induction of a calcium-binding protein
in the uterus of the laying hen.
Arch. Biochim. Biophys. 125, 378-380
- CORRADINO, R.A. and R.H. WASSERMAN (1971)
Vitamin D₃: induction of calcium-binding protein
in embryonic chick intestine in vitro.
Science 172, 731-733

CORRADINO, R.A., J.G. EBEL, P.H. CRAIG, A.N. TAYLOR,
R.H. WASSERMAN (1971 a)
Calcium-absorption and the vitamin D₃-dependent
calcium-binding protein.
Calc. Tiss. Res. 7, 81-92

CORRADINO, R.A., J.G. EBEL, P.H. CRAIG, A.N. TAYLOR,
R.H. WASSERMAN (1971 b)
Recovery from dietary strontium inhibition.
Calc. Tiss. Res. 7, 93-102

CORRADINO, R.A. (1973)
Embryonic chick intestine in organculture.
J. Cell Biol. 58, 64-78

DIRKSEN, G., P. PLANK, T. HÄNICHEN, A. SPIESS (1972)
Über eine enzootische Kalzinose beim Rind
5. Experimentelle Untersuchungen an Kaninchen mit
selektiver Verfütterung von Knaulgras (*Dactylis
glomerata*), Goldhafer (*Trisetum flavescens*) und
einem Gräsergemisch.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 79, 77-79

DIRKSEN, G., P. PLANK, U. SIMON, T. HÄNICHEN, P. DANIEL,
A. SPIESS (1974)
Über eine enzootische Kalzinose beim Rind
7. Nachweis der kalzinogenen Wirkung von Gold-
hafer (*Trisetum flavescens* L.P.B.) beim Wieder-
käufer.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 81, 1-5

DIRKSEN, G., P. PLANK, U. SIMON, T. HÄNICHEN, P. DANIEL,
A. SPIESS (1975)

Über eine enzootische Kalzinose beim Rind

8. Untersuchungen über die mögliche Bedeutung
des Sonnenlichtes (UV-Strahlen) bei der Entste-
hung der Kalzinose sowie Nachweis der kalzinogenen
Wirkung von getrocknetem Goldhafer (*Trisetum fla-
vescens* L.P.B.).

Dtsch. Tierärztl. Wschr. 82, 387-390

DRESCHER, D., H.F. DELUCA (1971 a)

Vitamin D-stimulated calcium-binding protein from
rat intestinal mucosa: purification and some proper-
ties.

Biochemistry 12, 2302-2307

DRESCHER, D., H.F. DELUCA (1971 b)

Possible precursor of vitamin D-stimulated calcium-
binding protein in rats.

Biochemistry 12, 2308-2312

EBEL, J.G., A.N. TAYLOR, R.H. WASSERMAN (1969)

Vitamin D-induced calcium-binding protein of
intestinal mucosa.

Am. J. Clin. Nutr. 22, 431-436

FEHER, J.J., R.H. WASSERMAN (1979)

Calcium-absorption and intestinal calcium-
binding protein: quantitative relationship.

Am. J. Phys. 236, 556-561

FREUND, T., F. BRONNER (1975)

Regulation of intestinal calcium-binding
protein by calcium-intake in the rat.
Am. J. Phys. 228, 861-869

FULLMER, C.S. and R.H. WASSERMAN (1973)

Bovine intestinal calcium-binding proteins:
purification and some properties.
Biochimica et Biophysica Acta 317, 172-186

HARMEYER, J. and H.F. DELUCA (1969)

Calcium-binding protein and calcium-absorption
after vitamin D-administration.
Arch. Biochem. Biophys. 133, 247-254

HARRISON, J.E., A.J.W. HITCHMAN, C.S. TAM (1975 a)

Relation between intestinal and renal calcium-
binding protein and dietary intake of Ca, P and
vitamin D.

In A.W. NORMAN, K. SCHAEFER, H.G. GRIGOLEIT,
D.v. HERRATH, E. RITZ

Vitamin D and problems related to uremic bone
disease, 75-81

Walter de Gruyter - Berlin - New York

HARRISON, J.E., A.J.W. HITCHMAN, C.S. TAM (1975 b)

Intestinal calcium-binding protein in animals
fed normal and rachitogenic diets: rat studies.
Canad. J. Physiol. Pharmacol. 53, 137-143

HASELBAUER, R. (1980)

Vergleichende Untersuchungen von *Trisetum flavescens*,
Cholecalciferol und 1,25-Dihydroxycholecalciferol
an Hühnerküken.

Vet. Med. Diss., München

HAUSSLER, M.R. and T.A. MC CAIN (1977)

Basic and clinical comments related to vitamin D-
metabolism and action.

N. Engl. J. Med. 297, 974-983

HILL, L.F., G.A. LUMB, E.B. MAWER, S.W. STANBURY (1973)

Indirect inhibition of the biosynthesis of 1,25-
dihydroxycholecalciferol in rats treated with a
diphosphonate.

Clin. Sci. 44, 335-347

HITCHMAN, A.J.W. and J.E. HARRISON (1972)

Calcium-binding protein in the duodenal mucosa of
the chick, rat, pig and human.

Canad. J. Biochem. 50, 758-765

HOLICK, M.F., H.K. SCHNOES, H.F. DELUCA, R.W. GRAY,
I.T. BOYLE, T. SUDA (1972)

Isolation and identification of 24,25-dihydroxy-
cholecalciferol, a metabolite of vitamin D₃ made
in the kidney.

Biochem. 11, 4251-4255

KALLFELZ, F.A., A.N. TAYLOR, R.H. WASSERMAN (1967)

Vitamin D-induced calcium-binding factor in rat
intestinal mucosa.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125, 54-58

KÖHLER, H., D.-S. REGAL, M. PETERLIK (1978)

Nachweis einer 1,25-Dihydroxycholecalciferol-artigen Substanz als Ursache der antirachitischen Wirkung von Goldhafer (*Trisetum flavescens*) bei Küken und Wachteln.

Zbl. Vet. Med. 25, 253-270

KOWARSKI, S. and D. SCHACHTER (1975)

Vitamin D-dependent particulate calcium-binding activity and intestinal calcium transport.

Am. J. Physiol. 229, 1198-1204

KRAFT, H. (1964)

Labormethoden der Veterinärmedizin bei Haussäugetieren.

Leik-Druck GmbH, Kelheim

KRAMPITZ, G., M. HAMM, J. ENGELS, R.M. WEGNER (1976)

Untersuchung zur Frage des molekularen Mechanismus der Eischalenbildung. 4. Mitteilung: Vorkommen und Bedeutung Vitamin D-abhängiger Systeme - eine Übersicht.

Arch. Geflügelk. 6, 214-220

KREISL, M. (1980)

Private Mitteilung, Diss. in Vorbereitung

LAWSON, D.E. (1970)

Vitamin D: new findings on its metabolism and its role in calcium nutrition.

Proc. Nutr. Soc. 29/30, 47-58

LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR, R.J. RANDALL
(1951)

Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275

MUSSER, M.A., W.L. BACON, K.E. NESTOR (1977 a)

Calcium-binding protein in the turkey and japanese
quail.

PoultrySci. 56, 1657-1658

MUSSER, M.A., A.H. CANTOR, W.L. BACON (1977 b)

Intestinal calcium-binding protein levels in the
one month old turkey poult.

Poultry Sci. 56, 1440-1442

NORMAN, A.W. (1974)

Gegenwärtige Vorstellungen zum biochemischen
Wirkungsmechanismus von Vitamin D₃.

Münch. med. Wschr. 116, 1585-1598

OLDHAM, S.B., J.A. FISCHER, L.H. SHEN, C.D. ARNAUD (1974)

Isolation and properties of a calcium-binding
protein from porcine parathyroid glands.

Biochemistry 13, 4790-4796

OMDAHL, J.L. and H.F. DELUCA (1971)

Strontium induced rickets: metabolic basis.

Science 174, 949-951

OMDAHL, J.L. and H.F. DELUCA (1972)

Rachitogenic activity of dietary strontium.

I. Inhibition of intestinal calcium absorption
and 1,25-dihydroxycholecalciferol synthesis.

J. Biol. Chem. 247, 5520-5526

OMDAHL, J.L. and P.A. THORNTON (1972)

Dihydrotachysterol induction of intestinal
calcium-binding activity in the chick.
Biochem. Pharmacol. 21, 231-238

PETERLIK, M., K. BURSAC, M.R. HAUSSLER, M.R. HUGHES,
R.H. WASSERMAN (1976)

Further evidence for the 1,25-dihydroxyvitamin
D-like activity of Solanum malacoxylon.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 70, 797-804

PETERLIK, M., D.-S. REGAL, H. KÖHLER (1977)

Eine 1,25-Dihydroxyvitamin-D-artige Substanz als
Ursache der kalzinogenen Wirkung des Goldhafers.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 84, 253-255

PETRIE, L. and R.G. BREEZE (1977)

Hypervitaminosis D and metastatic pulmonary
calcification in a cow.
The Veterinary Record 101, 480-482

RAMBECK, W.A. und H. ZUCKER (1977)

Isolierung eines Vitamin D-ähnlichen Steroids mit
Hilfe der HPLC.
Königsteiner Chromatographie - Tage, Okt. 1977

RAMBECK, W.A., A. WETZEL, O. KREUTZBERG, H. ZUCKER
(1979)

Distribution and activity of a vitamin D₃ compound
in trisetum flavescens.
Proc. 4th Workshop on Vitamin D, 33-36
Walter de Gruyter - Berlin - New York

- RAMBECK, W.A., W. OESTERHELT, M. VECCHI, H. ZUCKER
(1979 b)
Occurrence of cholecalciferol in the calcino-
genic plant *Trisetum flavescens*
Biochem. Biophys. Res. Comm. 87, 743-749
- RAMBECK, W.A., A. WETZEL, H. STARK (1979 c)
Distribution and activity of a Vitamin D₃
compound in *Trisetum flavescens*.
4th Workshop on Vitamin D, Berlin, Febr. 1979
Abstracts, S. 6
- SCHNEIDER, L.E., H.D. WILSON, H.P. SCHEDL (1973)
Intestinal calcium-binding protein in the
diabetic rat.
Nature 245, 327-328
- SOBEL, A.E., A. GOLDFARB, B. KRAMER (1934)
Studies of incurable rickets. I. Respective
role of the local factor and vitamin D in
healing.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 31, 869-870
- SPENCER, R., M. CHARMAN, P.W. WILSON, D.E.M. LAWSON
(1978)
Relationship between vitamin D-stimulated calcium
transport and intestinal calcium-binding protein
in the chicken.
Biochem. J. 170, 93-101
- STÄHLIN, A. (1969)
Grünfutter und Heu
In M. BECKER und K. NEHRING
Handbuch der Futtermittel, Bd. 1, S. 1-177
Verlag Paul Parey - Hamburg u. Berlin

STARK, H. (1979)

Untersuchungen zur lichtabhängigen Bildung
und Verteilung von Cholecalciferol im Gold-
hafer (*Trisetum flavescens*).

Vet. Med. Diss., München

STRÖHLE, H.-G. (1980)

Private Mitteilung, Diss. in Vorbereitung

TAYLOR, A.N. and R.H. WASSERMAN (1965)

A vitamin D₃-dependent factor influencing
calcium binding by homogenates of chick
intestinal mucosa.

Nature, 205, 248-250

TAYLOR, A.N. and R.H. WASSERMAN (1967)

Vitamin D₃-induced calcium-binding protein:
partial purification, electrophoretic visualization
and tissue distribution.

Arch. Biochem. Biophys. 119, 536-540

TAYLOR, A.N. and R.H. WASSERMAN (1972)

Vitamin D-induced calcium-binding protein:
comparative aspects in kidney and intestine.

Am. J. Physiol. 223, 110-114

TAYLOR, A.N. (1974)

In vitro phosphate transport in chick ileum:
effect of cholecalciferol, calcium, sodium and
metabolic inhibitors.

J. Nutr. 104, 489-494

- TRECHSEL, U., J.P. BONJOUR, H. FLEISCH (1976)
Influence of dietary calcium, phosphorus, and
vitamin D on the conversion of 25-hydroxy-
vitamin D₃ to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ by kidney
tubules of diphosphonate-treated quails.
Isr. J. Med. Sci. 12, 1494
- WASSERMAN, R.H. (1962)
Studies on vitamin D₃ and the intestinal ab-
sorption of calcium and other ions in the rachi-
tic chick.
J. Nutr. 77, 69-80
- WASSERMAN, R.H. and A.N. TAYLOR (1963)
Vitamin D₃, inhibition of radiocalcium binding by
chick intestinal homogenates.
Nature 198, 30-32
- WASSERMAN, R.H. and A.N. TAYLOR (1966)
Vitamin D₃ induced calcium-binding protein in
chick intestinal mucosa.
Science 152, 791-793
- WASSERMAN, R.H., R.A. CORRADINO, A.N. TAYLOR (1968)
Vitamin D-dependent calcium-binding protein:
Purification and some properties.
J. Biol. Chem. 243, 3978-3986
- WASSERMAN, R.H. and A.N. TAYLOR (1968)
Vitamin D-dependent calcium-binding protein,
response to some physiological and nutritional
variables.
J. Biol. Chem. 243, 3987-3993)

WASSERMAN, R.H. and A.N. TAYLOR (1969)

Mineral metabolism; some aspects of intestinal absorption of calcium, with special reference to vitamin D.

Academic Press, New York 3, 321-403

WASSERMAN, R.H. (1974)

Calcium absorption and calcium-binding protein synthesis: *Solanum malacoxylon* reverses strontium inhibition.

Science 182, 1092-1094

WASSERMAN, R.H. and A.N. TAYLOR (1974)

Die physiologische Bedeutung des Vitamin D-abhängigen calciumbindenden Proteins.

Triangel 12, 119-127

WASSERMAN, R.H. (1975)

Metabolism, function and clinical aspects of vitamin D.

Cornell Vet. 62, 3-25

WASSERMAN, R.H., L. KROOK, G. DIRKSEN (1977)

Evidence for anti-rachitic activity in the calcinogenic plant, *Trisetum flavescens*.

Cornell Vet. 67, 333-350

WOLF, M. (1976)

Untersuchungen über die kalzinogene Aktivität von *Trisetum flavescens* ((L.) P.B.) am Kaninchen.

Vet. Med. Diss., München

ZOLOCK D.T., R.L. MORRISSEY, D.D. BIKLE (1979)

Meaning of non-parallel 1,25-dihydroxycholecalciferol mediated response, relationship in intestine and bone to dose and time.

Proc. 4th Workshop on Vitamin D, 639-642

Walter de Gruyter - Berlin - New York

ZUCKER, H., O. KREUTZBERG, W.A. RAMBECK (1977)

Vitamin D-like action of a steroid from *Trisetum flavescens*.

In A.W. NORMAN, K. SCHAEFER, J.W. COBURN,
H.F. DELUCA, D. FRASER, H.G. GRIGOLEIT and
D.v. HERRATH

Vitamin D, biochemical, chemical and clinical aspects related to calcium metabolism, S. 85-87

Walter de Gruyter - Berlin - New York

Herrn Prof. Dr. H. Zucker danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die stets gewährte Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Dr. W.A. Rambeck danke ich für die jederzeit freundlich gewährte Hilfe und Beratung.

Bei Fräulein A.K. Probst bedanke ich mich herzlich für die geleistete Hilfe, bei Frau O. Kreutzberg und Frau A. Wetzl für die freundliche Beratung und Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. E. Scharrer danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im Isotopenlabor und, wie auch Fräulein B. Amman, für immer freundlich gegebene Ratschläge.

Den Kolleginnen Dr. R. Haselbauer, M. Kreisl und Dr. H. Stark, dem Kollegen Dr. P. Bittner und dem Doktoranden H.-G. Ströhle gilt mein besonderer Dank für die Bereitstellung der Tiere zu meinen Versuchen.

L e b e n s l a u f

Ich, Horst Nitsche, wurde am 30. August 1954 in Wartenberg/Obb. als jüngster Sohn des Personalleiters Karl Nitsche und seiner Ehefrau Edith, geborene Riedel, geboren.

Die ersten fünf Jahre meines Lebens verbrachte ich in Langenpreising/Obb., bis wir 1960 nach Rüsselsheim/Main umzogen.

1961 wurde ich in der Eichgrundschule in Rüsselsheim eingeschult. 1964 wechselte ich in das Max-Planck-Gymnasium in Rüsselsheim über. Dort legte ich im Mai 1973 mein Abitur ab.

Vom Juli 1973 bis zum September 1974 leistete ich meinen Wehrdienst.

Ab November 1974 studierte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München Tiermedizin.

Nach Bestehen der Tierärztlichen Prüfung am 8. November 1979 nahm ich wieder die Arbeit an meiner Dissertation am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie in der Tierärztlichen Fakultät der Universität München auf.

